

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2002年12月27日 (27.12.2002)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 02/103005 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/10, C12P 21/02, C12N 1/15, 1/19, 1/21, C12Q 1/68, A61K 38/00, 45/00, 48/00, 49/00, 35/76, G01N 33/53, 37/00, A01K 67/027

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/06057

(22) 国際公開日: 2002年6月18日 (18.06.2002)

(25) 国際公開の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2001-246789 2001年6月18日 (18.06.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP). 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルディング6階 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 諏訪 牧子 (SUWA, Makiko) [JP/JP]; 〒135-0064 東京都江東区青海2-4-1-6 独立行政法人産業技術総合研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 浅井 潔 (ASAI, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒135-0064 東京都江東区青海2-4-1-6 独立行政法人産業技術総合研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 秋山 泰 (AKIYAMA, Yutaka) [JP/JP]; 〒

135-0064 東京都江東区青海2-4-1-6 独立行政法人産業技術総合研究所臨海副都心センター内 Tokyo (JP). 油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒180-0003 東京都武蔵野市吉祥寺3-30-16 Tokyo (JP). 小田 晃司 (ODA, Koji) [JP/JP]; 〒170-8633 東京都豊島区高田3-2-4-1 大正製薬株式会社内 Tokyo (JP). 約谷 克樹 (TSURITANI, Katsuki) [JP/JP]; 〒170-8633 東京都豊島区高田3-2-4-1 大正製薬株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS

(54) 発明の名称: グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型の受容体

(57) Abstract: An automated system for finding a GPCR sequence is originally developed. Using this system, 1215 novel GPCRs are successfully identified from the whole human genome. Concerning three clones among them, cDNAs are isolated.

(57) 要約:

GPCR 配列を発見するための自動システムを独自に開発し、このシステムを利用してヒトゲノム全体から 1215 の新規 GPCR を同定することに成功した。そのうち 3 のクローンについて cDNA を単離した。



## 明細書

## グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型の受容体

技術分野

本発明は、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型受容体（以下、「GPCR」と称する）ファミリーに属する新規なポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにこれら分子の製造および用途に関する。

背景技術

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その9割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも膜貫通ヘリックス7本を有するGPCR (Baldwin, J. M. Curr. Opin. Cell Biol. 6, 180-190 (1994)., Strader, C. D., et al. FASEB. J. 9, 745-754 (1995)., Bockaert, J., Pin, J. P. EMBO. J. 18, 1723-1729 (1999).) を標的とする薬剤が大部分を占めている。このため GPCR は、ドラッグデザインを行うための遺伝子を発見する最も重要な標的の一つである。GPCR は、アドレナリン、アセチルコリンのような特異的リガンドによって誘導されるシグナル伝達に関係しており、その結合メカニズムの特徴は実験によって精力的に調べられている (Watson, S & Arkinsrtall, S. The G-protein Linked receptor Facts Book. (Academic Press, London))。

しかしながら、cDNA、EST、およびマイクロアレイ分析のような膨大なデータ源によっても、今までに発見される新規配列はごく限られたファミリーに過ぎない (Lee, D. K. et al. Brain Res. Mol. Brain Res. 31, 13-22 (2001).、Mizushima, K., et al. Genomics. 69, 314-321 (2000).、Matsumoto, M. et al. Gene. 28, 183-189 (2000).、Marchese, A., et al. Trends Pharmacol Sci. 20, 447 (1999).、Lee, D. K., FEBS. Lett. 446, 103-107 (1999).、



Yonger, R. M et al. Genome Research. 11, 519-530(2001).、Horn, F., et al. Nucleic Acids Res. 29, 346-349 (2001).)。GPCRdb(Lee, D. K. et al. Brain Res. Mol. Brain Res. 31, 13-22 (2001).)および PSI-BLAST によるコレクション(Josefson, L. G. Gene. 239, 333-340 (1999).)のような既知の GPCR 配列の大規模分類によってもなお、ゲノム全体レベルの幅広い解釈に至っていない。

従って、全体の 90%以上がすでに決定されているヒトゲノム配列 (International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409, 860-921 (2001)., Venter, J. C. et al. Science. 291, 1304- 1351(2001).)をスキャンすることによって、GPCR ファミリー全体を解明することは重要である。

### 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、ヒトゲノム配列から効率的に GPCR 配列を抽出する自動的手法を開発し、これにより新規 GPCR を網羅的に同定することにある。

また、本発明は、このようにして同定された新規 GPCR の用途を提供することをも目的とする。新規 GPCR の好ましい用途の一つの態様として、リガンドなどの医薬品候補化合物のスクリーニングのための用途を提供する。さらに、新規 GPCR の好ましい用途の他の態様として、本発明は、新規 GPCR の変異や発現異常を指標とした疾患の検査方法を提供する。

さらに、本発明は、新規 GPCR またはその活性を調節する分子の疾患の治療のための用途を提供する。

本発明者らは、上記課題を解決するため、まず、配列検索(Altschul, S. F. et al. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402 (1997).)、モチーフおよびドメイン帰属(Bateman, A., et al. Nucleic Acids Res. 28, 263-266 (2000).),



Bairoch, A. Nucleic Acids Res. 20, 2013-2018 (1992).)、膜貫通ヘリックスの予測(Hirokawa, T., et al. Bioinformatics. 14, 378-379 (1998).)のための解析方法を注意深く評価しながら、ヒトゲノム全体において GPCR 配列を発見するための自動システムを開発した。この自動システムは以下の3つの段階からなる。

第一段階は遺伝子の予測、すなわち、ゲノム配列からアミノ酸配列への翻訳である。既知の GPCR 遺伝子の多くはイントロンを含まないためヌクレオチド配列の6-フレーム展開を行うことでもある程度は対応できが、一方、複数のエキソンを有する配列では、遺伝子発見プログラムを用いて遺伝子構造全体を予測する必要がある。

第二段階は、アミノ酸配列の三重解析からなる。即ち、①既知の GPCR データベースに対する配列の検索、②モチーフおよびドメイン帰属ならびに③膜貫通ヘリックス (TMH) の予測である。前者の2つの技法は、近縁の GPCR 相同体を発見するために用いられ、一方、TMH 予測は遠縁の GPCR 相同体を扱うために用いられる。次に、3つの解析のそれぞれの結果の和集合をとることによって、候補配列をスクリーニングする。本発明者らは、スクリーニングの段階では候補配列の数をできる限り最大限にするために和集合を用いた。

第三段階は、重複配列を消去することによって、または誤予測によって分離された断片配列を融合することによって、遺伝子候補の質をさらに精密化する段階である。

この自動システムによれば効率的かつ網羅的に GPCR の配列を発見することができる。従来の方法では発見が困難であったマルチエクソンからなる GPCR の配列や遠縁のホモログ配列であっても発見することができる点もこの自動システムの大きな利点である。

本発明者らは、独自に開発したこの自動システムを利用して、ヒトゲノム全体から高い信頼度で保証された 1215 の新規 GPCR 配列を同定することに成功し、



そのうちの 3 つのクローンについて cDNA を単離した。新規 GPCR 配列の発見は、医薬品としての有用性が期待されるリガンド、アンタゴニストあるいはアゴニストのスクリーニングを可能とする。また、GPCR は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。このため、同定された GPCR の不適当な活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行なうことも可能である。同定された GPCR やそれらをコードするポリヌクレオチド、および同定された GPCR に対するリガンド、アンタゴニストあるいはアゴニストは、これら疾患に対する好適な治療薬となろう。

本発明は、新規な GPCR およびその遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関し、より詳しくは、以下の (1) から (32) を提供するものである。

(1) グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(b) 配列番号：1、3または5に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

(c) 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：1、3または5に記載の塩基配列からなる DNA にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

(2) 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド。

(3) (1) または (2) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(4) (1) または (2) に記載のポリヌクレオチドまたは (3) に記載のベクターを保持する宿主細胞。



(5) (1) または (2) に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

(6) (4) に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、(5) に記載のポリペプチドの製造方法。

(7) (5) に記載のポリペプチドに結合する抗体。

(8) (5) に記載のポリペプチドに対するリガンドの同定方法であって、

(a) (5) に記載のポリペプチドまたは (5) に記載のポリペプチドを発現している細胞若しくはその細胞膜と候補化合物とを接触させる工程、および

(b) 候補化合物が (5) に記載のポリペプチドまたは (5) に記載のポリペプチドを発現している細胞若しくはその細胞膜に結合するか否かを検出する工程、を含む方法。

(9) (5) に記載のポリペプチドに対するアゴニストの同定方法であって、

(a) (5) に記載のポリペプチドを発現している細胞と候補化合物とを接触させる工程、および

(b) 候補化合物が (5) に記載のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルを発生させるか否かを検出する工程、を含む方法。

(10) (5) に記載のポリペプチドに対するアンタゴニストの同定方法であって、

(a) 候補化合物の存在下で (5) に記載のポリペプチドを発現している細胞と

(5) に記載のポリペプチドに対するアゴニストとを接触させる工程、および

(b) 候補化合物の非存在下で検出した場合と比較して、(5) に記載のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルが減少するか否かを検出する工程、を含む方法。

(11) (8) に記載の方法により同定されたリガンド。

(12) (9) に記載の方法により同定されたアゴニスト。



(13) (10)に記載の方法により同定されたアンタゴニスト。

(14) (8)から(10)に記載の方法に用いるためのキットであって、下記(a)または(b)に記載の少なくとも一つの分子を含むキット。

(a) (5)に記載のポリペプチド

(b) (4)に記載の宿主細胞またはその細胞膜

(15) (5)に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記(a)から(c)に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

(a) (5)に記載のポリペプチドに対するアゴニスト

(b) (1)または(2)に記載のポリヌクレオチド

(c) (3)に記載のベクター

(16) (5)に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記(a)または(b)に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

(a) (5)に記載のポリペプチドに対するアンタゴニスト

(b) 生体内において、内因性の(5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

(17) (5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または(5)に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法。

(18) 以下の(a)～(d)の工程を含む、(17)に記載の検査方法。

(a) 被検者からDNA試料を調製する工程

(b) (5)に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を単離する工程

(c) 単離したDNAの塩基配列を決定する工程



(d) 工程 (c) により決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する工程。

(19) 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、(17) に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 調製した DNA 試料を制限酵素により切断する工程

(c) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(d) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

(20) 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、(17) に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) (5) に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

(21) 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、(17) に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) (5) に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

(22) 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、(17) に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) (5) に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程



(23) (5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法。

(24) 以下の(a)～(c)の工程を含む、(23)に記載の検査方法。

(a) 被検者から RNA 試料を調製する工程

(b) 該 RNA 試料に含まれる(5)に記載のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する工程

(c) 測定された RNA の量を対照と比較する工程

(25) 以下の(a)～(d)の工程を含む、(23)に記載の検査方法。

(a) 被検者から調製した cDNA 試料、および(5)に記載のポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(b) 該 cDNA 試料と該基板を接触させる工程

(c) 該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる(5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程

(d) 測定された(5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程

(26) 以下の(a)～(c)の工程を含む、(23)に記載の検査方法。

(a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる(5)に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

(27) (5)に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。



(28) (27)に記載のオリゴヌクレオチドを含む、(5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または(5)に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

(29) (7)に記載の抗体を含む、(5)に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または(5)に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

(30) (1)または(2)に記載のポリヌクレオチドが導入された哺乳動物  
(31) 内因性の(1)に記載のポリヌクレオチドの発現が人為的に抑制された哺乳動物

(32) マウスである、(30)または(31)に記載の哺乳動物

以下に本明細書に規定された用語の定義を示すが、これらは、本明細書中で使用される用語を理解を容易にする目的で記載されたものであり、本発明を限定する目的で用いられるべきではないことは理解されたい。

本明細書において「グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型受容体(GPCR)」とは、GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドであって、複数の塩基または塩基対からなる重合体を意味する。ポリヌクレオチドには、一本鎖型および二本鎖型のDNAを含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾された塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。

本明細書において用いられる「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸からなる重合体を意味する。従って、オリゴペプチドおよび蛋白質もまた、ポリペプチドの概念に含まれる。ポリペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾としては、アセチル



化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 $\gamma$ -カルボキシル化、グリコシル化、GPI アンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移 RNA 媒介付加、ユビキチン化などが含まれる。

本明細書において「単離」とは、本来の環境（たとえば自然に発生するのであればその自然環境）から取り出された物質（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、その自然状態から「人の手によって」変えられたものである。「単離」とは、対象化合物に実質的に富む試料中に存在する化合物および／または対象化合物が部分的または実質的に精製されている試料中に存在する化合物を含むことを意味する。ここで「実質的に精製した」という用語は、その天然の環境から切り離されて、天然に関連している他の成分を少なくとも 60%、好ましくは 75%、および最も好ましくは 90% 含まない化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指す。

本明細書において用いられる「変異」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の変化または塩基配列における塩基の変化（すなわち単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換、欠失、付加または挿入）を指す。従って、本明細書において用いられる「変異体」は、一つ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列または一つ以上の塩基が変化している塩基配列を指す。この変異体の塩基配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。変異体はアレリック変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。



変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的变化を有する。よりまれに、変異体は、非保存的置換を有する。生物学的または免疫学的活性を阻害することなく、いずれの、およびどれほど多くのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失するかを決定する手引きは、当技術分野において周知のコンピュータープログラム、例えば DNA スター・ソフトウェアを用いて発見することができる。

「欠失」は、その中で 1 つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ、天然に存在する GPCR または GPCR 関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化である。

「挿入」または「付加」は、天然に存在する GPCR または GPCR 関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド残基 1 つ以上が付加されたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

「置換」とは、天然に存在する GPCR または GPCR 関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、アミノ酸またはヌクレオチド 1 つ以上がそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドに入替えられたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

本明細書において用いられる「ハイブリダイズ」とは、核酸鎖が塩基対形成を通じて相補鎖と結合するプロセスを意味する。

本明細書で用いられる「治療」とは、概して、薬理的なおよび／または生理学的な効果を得ることを意味する。効果とは、疾患や症状を完全にあるいは部分的に妨げる点で予防的であってもよく、疾患の症状を完全にあるいは部分的に治療する点で治療的であっても良い。本明細書で用いられる「治療」という用語は、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療すべてを含んでいる。そしてさらに、疾患



の素因があるが未だ発病していると診断されていない被検者の発病の予防、疾患の進行を抑制すること、または疾患を軽減させることなどもこの用語に含まれる。

本明細書で用いられる「リガンド」とは、本発明のポリペプチドに結合する分子を意味する。リガンドには、天然リガンドおよび合成リガンドが含まれる。

「アゴニスト」とは、本発明のポリペプチドに結合し、それを活性化する分子を意味する。一方、「アンタゴニスト」とは、本発明のポリペプチドの活性化を阻害する分子を意味する。

#### <ポリペプチド>

本発明は、GPCR ファミリーに属する新規なポリペプチドを提供する。本発明に含まれる、本発明者等により同定された 3 のヒト由来のポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1、3 または 5 に、該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：2、4 または 6 に示す。

GPCR は、そのリガンドの作用により G 蛋白質の活性化を通じて細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有しており、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従って、本発明のポリペプチドは、その機能を調節するリガンド、アゴニストあるいはアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPCR が持つ生物学的特性としては、リガンドとの結合活性や三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、Ca<sup>2+</sup>を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑



制する Gi 型の 3 種類のカテゴリーに分類される (Trends Pharmacol. Sci. (99) 20:118)。従って、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内の cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の 1 つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5)) が含まれる。また、ポリペプチド中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号: 2、4 または 6) において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドが含まれる。

置換されるアミノ酸は、蛋白質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trp は、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、Asp および Glu が、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、His が挙げられる。

これらポリペプチドにおけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内であると考えられる。



本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4)を利用して本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列 (配列番号: 1、3 または 5) またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることは、通常行いうことである。このように本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされるポリペプチドであって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドもまた本発明のポリペプチドに含まれる。

このようなポリペプチドを単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードする DNA を単離するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素 (例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブ



リダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 40% 以上、好ましくは 60% 以上、さらに好ましくは 80% 以上、さらに好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは少なくとも 95% 以上、さらに好ましくは少なくとも 97% 以上 (例えば、98~99%) の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列 (配列番号: 1、3 または 5) の一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることも可能である。

本発明のポリペプチドは「成熟」タンパク質の形であっても、融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。本発明のポリペプチドには、分泌すなわちリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製



に役立つ配列、または組換え生産の際の安定性を確保する付加的配列などが含まれていてもよい。

#### <ポリペプチドの断片>

本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上（例えば、15 アミノ酸残基以上）の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション (truncation) ポリペプチドが含まれる。また、 $\alpha$ ヘリックスと $\alpha$ ヘリックス形成領域、 $\beta$ シートと $\beta$ シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 $\alpha$ 両親媒性領域、 $\beta$ 両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、本発明のポリペプチドの活性を媒介するものである。例えば、リガンドが結合して細胞内ヘシグナル伝達を行なう活性を有する断片が挙げられる。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含まれる。これらのポリペプチド断片は、抗原活性を含めた本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型



的なこうした置換は、Ala, Val, Leu と Ile の間、Ser と Thr の間、酸性残基 Asp と Glu の間、Asn と Gln の間、塩基性残基 Lys と Arg の間、または芳香族残基 Phe と Tyr の間で起こる。

また、リガンドに結合して細胞内にシグナル伝達を行わない断片は、本発明のポリペプチドの競合阻害剤になり得るため有用であり、このような断片も本発明に含まれる。

#### <ポリペプチドの製造>

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより製造されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドの製造のための手段は当業界でよく理解されている。組み換え的なポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したポリペプチドを精製することにより調製することが可能である。一方、天然由来のポリペプチドは、例えば、後述する本発明のポリペプチドに対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション (例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照) などにより本発明のポリペプチドを調製することも可能である。本発明のポリペプチドの断片は、例えば、本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。



### <ポリヌクレオチド>

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1、3または5に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、遺伝コードの縮重により配列番号：1、3または5に記載の塩基配列と異なる塩基配列からなるが配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、さらに、これらポリヌクレオチドがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドの配列とその全長において少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上（例えば、98~99%）同一である塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。塩基配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100, wordlength = 12 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)。本発明のポリヌクレオチドには、上記のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。



本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、例えば、細胞中の mRNA から誘導された cDNA ライブラリーから得ることができる。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノム DNA ライブラリーのような天然源から得ることができ、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1、3または5）と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーション技術（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4）や遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を利用して調製することができる。即ち、ハイブリダイゼーション技術を利用して、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1、3または5）またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離することができる。また、遺伝子増幅技術を用いて、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1、3または5）の一部を基にプライマーを設計し、該ポリヌクレオチドの配列と相同性の高いポリヌクレオチドを単離することができる。従って、本発明には、配列番号：1、3または5に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーション



ンのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号：1、3または5に記載の塩基配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5))を利用して調製することもできる。また、このようなポリヌクレオチドは、自然界における変異により生じることもある。本発明には、このような塩基配列の変異により、配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などされたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片単独、他のコード配列（例えば、リーダーもしくはは分泌配列、ブレイクもしくははブレイクタンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードするもの）と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカ配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカ配列は、pcDNA3.1/Myc-His ベクター(Invitrogen 社)により提供されかつ Gentz ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824 に記載されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド、または Myc タグである。また、このポリヌクレオチドは 5' および 3' 非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、および mRNA 安定化配列を含んでもよい。



<プローブ・プライマー・アンチセンス・リボザイム>

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：1、3または5に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15~100ヌクレオチド、好ましくは15~35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリッジェントな条件下で、本発明者らにより同定されたヌクレオチド（配列番号：1、3または5）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの活性の異常や該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常を検査・診断するために利用できる。



また、これらヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンス DNA（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンス RNA をコードする DNA）やリボザイム（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有する RNA をコードする DNA）が含まれる。

アンチセンス DNA が標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつくられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コード近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生物化学実験講座 2 核酸 IV 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp.319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス DNA は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチ



センス配列を含む DNA も、本発明で利用されるアンチセンス DNA に含まれる。使用されるアンチセンス DNA は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンス DNA の配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写された RNA は、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90% 以上、最も好ましくは 95% 以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。

このようなアンチセンス DNA には、本発明のポリペプチドの異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明のポリペプチドをコードする DNA（例えば、配列番号：1、3 または 5）の配列情報を基にホスホロチオネート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードする DNA を利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有する RNA 分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でも RNA を切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNA の部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループ I イントロン型や、RNaseP に含まれる MIRNA のように 400 ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる 40 ヌクレオチド程度の活性ドメ



インを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191)。

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M.Koizumi ら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumi ら, (1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35:2191、M.Koizumi ら, (1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド(配列番号: 1、3または5)中には標的となりうる部位が複数存在する。

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングススポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349, 1986)。このリボザイムも、標的的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi および N.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋, (1992) 化学と生物 30:112)。

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

<ベクター、宿主細胞、ポリペプチドの製造>



本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明のポリヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの生産方法を提供する。

本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター (Invitrogen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)) などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞 (例: ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞 (例: 酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞 (例: ドロソフィラ S2、スボドプテラ SF9)、動物細胞 (例: CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞) および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェク



タミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して困因性であっても、異種シグナルであってもよい。

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にポリペプチドを回収する。

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

#### <検査方法>

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法を提供する。GPCR は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。従って、本発明のポリペプチドの不適當な活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行なうことも可能である。

本発明において「疾患の検査」とは、疾患の症状を呈している被検者の治療戦略を立てるための検査のみならず、被検者が疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う予防のための検査も含まれる。



本発明の検査方法の一つの態様は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出ことを含む方法である。

一つの方法は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域の塩基配列を直接決定することによって検査を行う方法である。この方法においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。DNA 試料は、被検者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から抽出した染色体 DNA あるいは RNA を基に調製することができる。染色体 DNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えば染色体 DNA を適当な制限酵素で切断し、ベクターにクローニングして、ゲノムライブラリーを作製すればよい。RNA から本方法の DNA 試料を調製するには、例えば、逆転写酵素を用いて、RNA から cDNA ライブラリーを作製すればよい。本方法においては、次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を単離する。該 DNA の単離は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズするプローブを用いて、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーのスクリーニングをすることにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノム DNA ライブラリー、cDNA ライブラリー、あるいは RNA を鋳型とした PCR によって単離することもできる。本方法においては、次いで、単離した DNA の塩基配列を決定する。選択した DNA の塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。本方法においては、次いで、決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する。本方法における「対照」とは、正常な（野生型の）本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA の塩基配列を言う。このような比較の結果、被検者の DNA の塩基配列が対照と異なっていた場合には、被検者は、疾患に罹患しているまたは発症の危険があると判定される。



本発明の検査方法は、上記の如く直接被検者由来の DNA の塩基配列を決定する方法以外に、種々の方法を用いることができる。

その一つの方法においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、調製した DNA 試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を制限酵素により切断する。次いで、DNA 断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する。

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP) を利用した方法や PCR-RFLP 法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じる DNA 断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分を PCR 法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体 DNA をこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロープ DNA を用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することができる。この方法では、ゲノム DNA 以外にも被検者から調製した RNA を逆転写酵素で cDNA にし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、この cDNA を鋳型として PCR で本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。



別の方法は、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる。次いで、解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する。

このような方法としては、例えば PCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、PCR Methods Appl. 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数の DNA 試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖 DNA 断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離した DNA 鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖 DNA が異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖 DNA の高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することにより DNA 断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異が存在することを検出することができる。

具体的には、まず、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を PCR 法等によって増幅する。増幅される範囲としては、



通常 200～400bp 程度の長さが好ましい。PCR は、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCR の際に、 $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅 DNA 産物を標識することができる。あるいは PCR 反応液に  $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えて PCR を行うことにより、増幅 DNA 産物を標識することも可能である。さらに、PCR 反応後にクレノウ酵素等を用いて、 $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅 DNA 断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識された DNA 断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5 から 10% 程度）のグリセロールを添加することにより、DNA 断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各 DNA 断片の性質により変動するが、通常、室温（20 から 25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには 4 から 30℃までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA 断片の移動度を、X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスクANNER 等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCR によって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識した DNA を使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

さらに別の方法は、まず、被検者から DNA 試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を増幅する。さらに、増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する。



このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル (denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE 法) 等を例示することができる。DGGE 法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA 断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによって DNA 断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定な DNA 断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺の DNA 配列はその不安定さのために、部分的に 1 本鎖へと解離する。この部分的に解離した DNA 断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖 DNA の移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含む DNA を本発明のプライマー等を用いた PCR 法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在する DNA 断片の場合、より低い変性剤濃度位置で DNA 断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料 DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼ A ミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を含む DNA を PCR 法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ対照 cDNA 等から調製した標識 RNA とハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリ



ッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼ A によって切断し、これをオートラジオグラフィー等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

本発明の検査方法の他の態様は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを含む方法である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNA およびタンパク質が含まれる。

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査法においては、まず、被検者から RNA 試料を調製する。次いで、該 RNA 試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドをコード RNA の量を対照と比較する。

このような方法としては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたノーザンブロットング法、または本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーを用いた RT-PCR 法等を例示することができる。

また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査においては、DNA アレイ（新遺伝子工学ハンドブック、村松正實・山本雅、羊土社、p280-284）を利用することもできる。具体的には、まず、被検者から調製した cDNA 試料、および本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する。基盤に固定されるポリヌクレオチドプローブは、複数種の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するために、複数種であってもよい。被検者からの cDNA 試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。cDNA 試料の調製の好ましい態様においては、まず被検者の細胞から全 RNA の抽出を行う。細胞としては、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料の細胞などが例示できる。全 RNA の抽出は、例えば次のようにして行うことができる。純度の



高い全 RNA が調製できる方法であれば、既存の方法およびキット等を用いることが可能である。例えば Ambion 社 “RNA later” を用い前処理を行った後、ニッポンジーン社 “Isogen” を用いて全 RNA の抽出を行う。具体的方法にはそれらの添付プロトコルに従えばよい。次いで、抽出した全 RNA を鋳型として、逆転写酵素を用いて cDNA の合成を行い、cDNA 試料を調製する。全 RNA からの cDNA の合成は、当業者に周知の方法で実施することができる。調製した cDNA 試料には、必要に応じて、検出のための標識を施す。標識物質としては、検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、蛍光物質、放射性元素等を挙げることができる。標識は、当業者によって一般的に行われる方法(L Luo et al., Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nat Med. 1999, 117-122)で実施することができる。

本発明において「基板」とは、ポリヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明の基板は、ポリヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般に DNA アレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

DNA アレイ技術の利点は、ハイブリダイゼーションの溶液量が非常に少なく、固定されたヌクレオチドプローブに、細胞の全 RNA に由来する cDNA を含む非常に複雑なターゲットをハイブリダイズすることができることである。一般に DNA アレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらの DNA は非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。ヌクレオチドの固定(アレイ)には2つのタイプがあり、一つは Affymetrix 社開発によるポリヌクレオチドを基本としたアレイであり、もう一つは主として Stanford 大学で開発された cDNA のアレイである。ポリヌクレオチドのアレイにおいて、ポリヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographic の技



術 (Affymetrix 社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット (Rosetta Inpharmatics 社) 技術等によるポリヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。基板に固定するポリヌクレオチドプローブは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリダイズするものであれば特に制限はない。本発明のポリヌクレオチドプローブには、ポリヌクレオチド、または cDNA が含まれる。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと実質的にハイブリダイズし、それ以外のポリヌクレオチドとは実質的にハイブリダイズしないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ポリヌクレオチドプローブは、検出の対象となるポリヌクレオチドの塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。基板に結合するポリヌクレオチドプローブの長さは、通常 cDNA を固定する場合 100~4000 ベースであり、好ましくは 200~4000 ベースであり、さらに好ましくは 500~4000 ベースである。合成ポリヌクレオチドを固定する場合は、通常 15~500 ベースであり、好ましくは 30~200 ベースであり、さらに好ましくは 50~200 ベースである。基板へのポリヌクレオチドの固定の工程は、一般に「プリント」とも呼ばれる。具体的には、例えば以下のようにプリントすることができるが、これに限定されるものではない。数種のポリヌクレオチドプローブを 4.5 mm x 4.5 mm の一つの領域内にプリントする。その際、それぞれのアレイをプリントするのには一つのピンを用いて行うことが可能である。従って 48 ピンのツールを用いた場合、48 回の繰り返したアレイを一つの標準的な顕微鏡用スライドにプリントすることが可能である。

本方法においては、次いで、該 cDNA 試料と該基板を接触させる。本工程により、本発明のポリペプチドをコードする DNA と特異的にハイブリダイズ可能な基板上のヌクレオチドプローブに対し、cDNA 試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチド



プローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

本方法においては、次いで、該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する。さらに、測定された本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する。

本発明においては、cDNA 試料中に本発明のポリペプチドをコードする遺伝子由来の cDNA が存在する場合、基板に固定されたヌクレオチドプローブと該 cDNA とがハイブリダイズする。従って、ポリヌクレオチドプローブと該 cDNA とのハイブリダイズの強度を検出することにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定することができる。ポリヌクレオチドプローブと該 cDNA とのハイブリダイズの強度の検出は、cDNA 試料を標識した物質の種類に応じて当業者においては適宜行うことができる。例えば、cDNA が蛍光物質によって標識された場合、スキャナーによって蛍光シグナルを読み取ることによって検出することができる。

本発明の方法においては、被検者および対照（健常者）由来の cDNA 試料について、異なる蛍光物質で標識を施すことにより、1 回の測定でそれぞれにおける本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を同時に測定することができる。例えば、上記それぞれの cDNA 試料の一方を蛍光物質である Cy5 で、他方を Cy3 で標識することができる。それぞれの蛍光シグナルの相対強度は、被検者および対照での本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量に応じた相対量を示す(Duggan et al., Nat. Genet. 21: 10-14, 1999)。

一方、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の翻訳レベルにおける検査においては、まず、被検者からポリペプチド試料を調製する。次いで、該ポリペプチド試料に含まれる本発明のポリペプチドの量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドの量を対照と比較する。



このような方法としては、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法、並びに本発明のポリペプチドに結合する抗体を用いた、ウェスタンブロットリング法、ドットブロットリング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

上記の方法において、対照と比較して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量が有意に変化していた場合、被検者は、該遺伝子の発現異常に関連した疾患を罹患している、または該疾患を発症する危険を有すると判定される。

#### <検査薬>

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬を提供する。

その一つの態様は、上記した本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその発現制御領域を含む DNA にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む検査薬である。該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を検出するためのプローブとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を増幅するためのプライマーとして用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得されるの二本鎖 DNA 断片として作製することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの 5' 端を  $^{32}\text{P}$  でリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等の DNA ポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして  $^{32}\text{P}$  等のアイソトープ、蛍光色素、またはビ



オチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

本発明の検査薬の他の一つの態様は、後述する本発明のポリペプチドに結合する抗体を含む検査薬である。該抗体は、上記の本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドを検出するために用いられる。抗体は、本発明のポリペプチドを検出可能であればその形態に制限はない。検査のための抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体は必要に応じて標識されていてもよい。

上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSA やゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

#### <抗体>

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらに Fab または他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含む Fab フラグメントが含まれる。

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得る



ことができる。本発明のポリペプチドあるいはその GST との融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエロマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティークラム等により精製することで、調製することが可能である。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。本発明のポリペプチドに結合する抗体は、本発明のポリペプチドの発現異常に関連した疾患の検査において、本発明のポリペプチドの発現量を測定するために用いることもできる。

#### <リガンド、アゴニスト、アンタゴニストの同定>

本発明のポリペプチドは、そのリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストの同定において使用することができる。同定の対象となるこれら分子は、天然由来であっても、人工的に合成された構造的または機能的な模倣物であってもよい。本発明のポリペプチドは多くの病理を含めて多数の生物学的機能に関与している。従って、本発明のポリペプチドを活性化する化合物および本発明のポリペプチドの活性化を阻害し得る化合物を発見することが望まれる。



本発明のポリペプチドに対するリガンドの同定においては、まず、本発明のポリペプチドと候補化合物とを接触させ、次いで、候補化合物が本発明のポリペプチドに結合するか否かを検出する。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々の GPCR のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド（例えば、ケミカルファイルに登録されているもの）あるいはファージ・ディスプレイ法（J.Mol.Biol. (1991) 222, 301-310）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

本方法においては、精製された本発明のポリペプチドを用いて候補化合物との結合を検出することができる。結合の検出には、例えば、本発明のポリペプチドのアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明のポリペプチドに結合する化合物を精製する方法やウエストウエスタンブロットティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、候補化合物は適宜標識し、この標識を利用して本発明のポリペプチドとの結合を検出することができる。また、本発明のポリペプチドを発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance）の変化で検出する方法

（Nature Biotechnology (99) 17:1105）を用いることも可能である。さらに、候補化合物と本発明のポリペプチドとの結合活性は、本発明のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルを指標に検出することもできる。このようなシグナルとしては、例えば、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの変化、細胞内の cAMP レベルの変化、細胞内の pH の変化、細胞内のアデニル酸シクラーゼレベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。



この方法の1つの実施例として、本発明のポリペプチドを発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM  $MgCl_2$ , 50  $\mu$ M GDP 溶液中で、 $^{35}S$  で標識された GTP  $\gamma$ S 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) を行い、結合した GTP  $\gamma$ S の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また GPCR は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 $Ca^{2+}$ を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の3種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白質  $\alpha$ サブユニットと他の G 蛋白質  $\alpha$ サブユニットとをキメラ化し、あるいは promiscuous な G  $\alpha$ 蛋白質、G  $\alpha$ 15、G  $\alpha$ 16 を用いてリガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 $Ca^{2+}$ 上昇に帰結させることが可能である。上昇した  $Ca^{2+}$ レベルは、TRE (TPA responsive element) または MRE (multiple responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fura-2、Fluo-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白質  $\alpha$ サブユニットと他の G 蛋白質  $\alpha$ サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP 上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element)を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (Trends Pharmacol.Sci. (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明のポリペプチドを発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などの哺乳動物細胞、酵母、シウジョウバエ由来の細胞、または大腸菌細胞を例示することができる。本発明のポリペプチドを脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いるこ



とができる。例えば、SV40の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (Mol.Cell.Biol.(1981)1,854-864) や、pEF-BOS (Nucleic Acids Res.(1990)18,5322)、pCDM8 (Nature(1987)329,840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、GPCRを発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明のポリペプチドをコードする DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、FuGENE6 試薬 (ペーリンガーマンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

本発明のポリペプチドに対するアゴニストの同定においては、本発明のポリペプチドを発現している細胞と候補化合物とを接触させ、候補化合物が本発明のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルを発生させるか否かを検出する。即ち、上記した、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用いたりガンドの同定法において、候補化合物の作用により、本発明のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルを発生させる化合物を同定する。このような化合物は、本発明のポリペプチドに対するアゴニストの候補となる。

本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストの同定においては、候補化合物の存在下で本発明のポリペプチドを発現している細胞と本発明のポリペプチドに対するアゴニストとを接触させ、候補化合物の非存在下で検出した場合 (対照) と比較して、本発明のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルが減少するか否かを検出する。即ち、上記した、本発明のポリペプチドを発現する細胞を用いたりガンドの同定法において、該細胞に対し、候補化合物に加えてアゴニストを



作用させ、アゴニスト刺激に応答した本発明のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルの発生を抑制する化合物を同定する。このような化合物は、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニストの候補となる。本発明のポリペプチドの潜在的なアンタゴニストの例としては、抗体、ある場合には、リガンドと密接な関係があるポリペプチド（例えば、リガンドの断片）、または本発明のポリペプチドと結合するが応答を誘導しない（それゆえ該受容体の活性を妨げる）小分子などが挙げられる。

本発明は、また、上記同定方法に用いるためのキットを提供する。このキットは、本発明のポリペプチドまたは本発明のポリペプチドを発現する細胞若しくはその細胞膜を含む。該キットには、GPCRのリガンド、アゴニスト、あるいはアンタゴニストの候補となる化合物が含まれていてもよい。

#### <疾患の治療のための医薬組成物>

本発明は、本発明のポリペプチドの活性または発現を増加または抑制させる必要がある患者を治療するための医薬組成物を提供する。

本発明のポリペプチドの活性または発現を増加させるための、医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリペプチドに対するアゴニスト、本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクターを用いることができる。一方、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制させるための、医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリペプチドに対するアンタゴニスト、生体内において、内因性の本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドを用いることができる。アンタゴニストには、内因性の本発明のポリペプチドとの競合状態でリガンドと結合する能力がある可溶性形態の本発明のポリペプチドが含まれる。このような競合物質の典型的な例は、本発明のポリペプチドの断片である。本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を



抑制するポリヌクレオチドとしては、上記したアンチセンス DNA やリボザイムが含まれる。

治療用化合物を医薬品として用いる場合には、該化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。

患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

遺伝子治療用ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを例示することができる。該ベクターを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ目的の DNA の投与を行うことができる。

#### <トランスジェニック動物、ノックアウト動物>

本発明は、上記本発明のポリヌクレオチドが導入された哺乳動物または内因性の該ポリヌクレオチドの発現が人為的に抑制された哺乳動物を提供する。これら哺乳動物の作製は、当業者に公知の手法で行うことができる。これら哺乳動物は、好ましくはげっ歯類であり、最も好ましくはマウスである。これら哺乳動物は、



例えば、本発明のポリヌクレオチドが関連する疾患のモデル動物としての利用が可能である。

### 図面の簡単な説明

図 1 は、既知の GPCR 配列を、GPCR 配列 1,054 個および非 GPCR 配列 64,154 個を含む評価用データベースに対して検索した際、E 値に対してプロットした GPCR 配列同士対の数および GPCR 配列と非 GPCR 配列の対の数を示す図である。

図 2 は、クローン 13434、10876、13860 の各臓器における発現を解析した結果を示す電気泳動写真である。グラフは、左から、心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、大腸、白血球、肺癌、大腸癌、肺癌、前立腺癌、大腸癌、卵巣癌、膵癌である。

図 3 は、図 2 の結果をグラフで示した。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により、本発明のポリペプチドの同定に関して詳細に説明する。

#### [実施例 1] ヒトゲノムデータからのアミノ酸配列の抽出

本発明者らは、GPCR 遺伝子発見のための第一段階、即ち、配列抽出段階において、ヒトゲノム配列から開始コドンおよび停止コドンのあいだに存在する 6 フレーム翻訳配列の全ての候補体を選択した (6F 展開配列)。同一の配列上で開始コドン (ATG) が多数見つかる場合には最も長い配列を選択した。一方、複数のエキソンを有する配列を検出するために、遺伝子発見プログラム

(GeneDecoder) (Asai, K., et al. Pacific Symposium on Biocomputing 98, pp.228-239 (PSB98, 1998).)を用いて、蛋白質コード領域を発見した (GD 配列)。GPCR 蛋白質は、長さが約 20 残基程度の 7 個の膜貫通ヘリックスを有するため、双方の配列ともに 150 残基以上 ( $>20 \times 7$ ) 必要であるとの条件をつけた。



6-フレーム翻訳により 375,412 配列。および、GeneDecoder により 95,900 配列を予測した。前者の配列はイントロンを含まない場合に対応し、後者は主に複数のエキソンで構成される。

なお、GeneDecoder は隠れマルコフモデル (HMM) を用いた遺伝子発見プログラムであり、配列類似性とエキソン長の分布に関する情報も利用する。このプログラムを、複数のエキソンから成る配列 462 個およびエキソン 2,843 個を含む Genset98 (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il/databases/gensets/Human/>) を用いて評価したところヌクレオチドレベルで 97.6%の感度と 40.4%の選択性を示し、一方、正しいエキソン境界を検出するために 64.2%の感度、21.3%の選択性を示すことがわかった。

#### 〔実施例 2〕 三重解析

三重解析の段階において、本発明者らは、配列検索のために BLASTP(Altschul, S. F. et al. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402 (1997).)、ドメインおよびモチーフの帰属のために PFAM データベース(Bateman, A., et al. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266 (2000).)および PROSITE(Bairoch, A. *Nucleic Acids Res.* 20, 2013-2018 (1992).)データベース、ならびに TMH 予測には本発明者らの独自のアルゴリズムである TMWindows を使い、さらに Mitaku の方法 (Hirokawa, T., et al. *Bioinformatics.* 14, 378-379 (1998).)を加味した。具体的には、以下の通りである。

(1) BLASTP を用いて、配列抽出段階で得たアミノ酸配列 (6F 展開配列、GD 配列) を SWISSPROT データベースに対して検索し、E 値  $<10^{-10}$  または  $10^{-50}$  で既知の GPCR 配列と一致する配列を列挙した。

(2) HMMER プログラムを用いて 6F 展開配列、GD 配列に PFAM データベース注の GPCR に特有なドメインを E 値  $<1.0$  または  $<10^{-10}$  で帰属できた配列を列挙した。同時に PROSITE(Bairoch, A. *Nucleic Acids Res.* 20, 2013-2018



(1992).)データベース中のGPCRに特有なモチーフパターンを $P$ 値 $<2 \times 10^{-3}$ または $<10^{-5}$ で帰属できた配列を列挙した。

(3) TMWindows および Mitaku の方法を用いて、6F 展開配列、GD 配列の膜貫通ヘリックス本数を予測した。例えば TMWindows によって 7 本と予測した結果および Mitaku の方法で 6 本～8 本の範囲で予測された結果の和集合の関係を {TMWindows(7)または Mitaku(6-8)} と記載すると、{TMWindows(7)または Mitaku(6-8)}、{TMWindows(7)または Mitaku(7)} ならびに {TMWindows(7)かつ Mitaku(7)} として用意した各条件に一致した配列を列挙する。

以上の解析において使われたプログラムやデータベースについて詳細を記述する。PFAM は、隠れマルコフモデル (HMM) によって記述された蛋白質ドメインデータベースであり、HMMER (Bateman, A., et al. *Nucleic Acids Res.* 28, 263-266 (2000).) は、それらを配列に帰属し、その有意性を  $E$  値でスコア付けする。一方、PROSITE は、正規表現によって記述されたモチーフパターンである。本発明者らは帰属の有意性をスコア付けするため、各残基の出現確率を乗算した ( $P$  値) を指標とした。例えば、正規表現パターンが  $A-[T,S]-G$  である場合、 $P$  値は  $P_A * \{P_t + P_s\} * P_G$  である。

TMWindows は、TMH 予測に関する本発明者独自のプログラムである。これは、Engelman-Staitz-Goldman (Engelman, D. M., et al. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 15, 321-353. (1986).) の疎水性指数をアミノ酸残基ごとに割り付け、9 つの異なるウインドウ幅 (19～27 残基) で全配列をスキャンする。この指標は AAindex データベース (Tomii, K. & Kanehisa, M. *Protein Eng.* 9, 27-36 (1996).) に含まれたあらゆる指数の比較を通して膜タンパク質解析に最も適した指標として決定した。それぞれのウインドウ幅に関して、平均疎水性指数  $>2.5$  である連続領域を、膜貫通ヘリックスとして予測する。それぞれの異なるウインドウセットで予測される数は、ヘリック



スの本数の範囲を意味する。一方、Mitakuの方法は、物理化学パラメータを用いてヘリックスの本数を予測する。

これらの解析で使われた閾値は、本発明者がそれぞれの方法を評価することで得たものである。評価に用いた参考データセットは、SWISSPROTバージョン39(Bairoch, A. & Apweiler, R. *Nucleic Acids Res.* 28, 45-48 (2000).)から断片配列を除外することによって得た配列である。これは、既知のGPCR配列1,054個および非GPCR配列64,154個を含む。以下に解析法の具体的な評価手順を示す。

(1) BLASTPを用いて、既知のGPCR配列1,054個を評価用データセットに対して検索し、正確および非正確な対の識別に関する感度、選択性を各E値に対して計算した。

(2) HMMERを用いて、GPCRに特有なPFAMドメインを評価用データセットの配列に帰属し、E値の感度および選択性を正確および非正確帰属の数に対して計算した。一方、PROSITEパターンに関して、P値の感度および選択性を、正確および非正確帰属の数に関して計算した。

(3) TMH予測ツールは、一般的にヘリックスの真の数を予測することにおいてあまり正確ではない。しかし、予測されるヘリックスの本数を、6~8本、5~9本、または4~10本等というように広く取れば、真の7本の膜貫通ヘリックスタイプを検出するための感度を明らかに増加できる。TMWindowsおよびMitakuの方法のいずれに関して、われわれは4通りの範囲、7、6~8、5~9、4~10を考慮し、お互いの全ての組合せ(16通り)に対して、真の7本の膜貫通ヘリックスを検出する感度および選択性を計算した。

評価を通じて、本発明者らは2つの閾値すなわち最善感度閾値と最善選択性閾値に重点を置いた。前者の閾値は、疑陽性が最小になりほぼ100%の感度を得ることを意図しており、一方、後者は疑陰性が最小になりほぼ100%の選択性を得ることを意図している。



例えば、BLASTP の閾値の評価を図 1 に示す。左矢印が示す線は GPCR 同士の対の個数を表し、右矢印が示す線は GPCR と非 GPCR 配列との対を示す。E 値が  $10^{-50}$  未満である領域では、境界域周辺のいくつかの無関係な対を除いてほぼ全ての対が GPCR 配列同士のものであった。これは最善選択性閾値に対応する。興味深いことに、これらの疑陽性は、膜貫通ヘリックスを 1 本だけ持つ受容体の特徴的な LDL 受容体ドメインまたは EGF 因子ドメインとの一致によって引き起こされた。E 値が  $10^{-10}$  未満の場合、疑陽性は 115 個であったがほとんど全ての GPCR が範囲に含まれた。この境界域は最善感度閾値に対応する。

同様に、本発明者らは、表 1 に要約したように、それぞれのツールの閾値を評価しそれらを基に 4 つのレベルのデータセットを作成した。

表 1

	Level A (最善選択性)	Level B	Level C	Level D (最善感度)
BLASTP	$E < 10^{-50}$ (99%, 100%)	$E < 10^{-10}$ (100%, 90.1%)	$E < 10^{-10}$ (100%, 90.1%)	$E < 10^{-10}$ (100%, 90.1%)
PFAM	$E < 10^{-10}$ (95%, 99.6%)	$E < 1.0$ (100%, 84.3%)	$E < 1.0$ (100%, 84.3%)	$E < 1.0$ (100%, 84.3%)
PROSITE	$P < 10^{-5}$ (90%, 100%)	$P < 2 \times 10^{-3}$ (100%, 95.0%)	$P < 2 \times 10^{-3}$ (100%, 95.0%)	$P < 2 \times 10^{-3}$ (100%, 95.0%)
TMH 予測	不使用	{TMHwindows (7) and Mitaku (7)} (36.0%, 70.6%)	{TMHwindows (7) or Mitaku (7)} (86.8%, 44.6%)	{TMHwindows (7) or Mitaku (6-8)} (99.3%, 28.8%)

ここで、各プログラムの閾値の下括弧内には、その閾値を用いたときの感度(左)と選択性(右)を表す。

最も信頼の置けるデータ(レベル A, 最善選択性データセット)は、BLASTP、PFAM、および PROSITE の最善選択性閾値から得られた配列の和集合によって得られた。これに加え、関係の遠い GPCR 配列を発見するために、TMH 予測閾値の 3 つのレベル(表 1)による結果と BLASTP、PFAM および PROSITE の最善感度閾



値による結果との和集合を得た。次に、最も感度の高いデータセットを最善感度データセットとして準備した（レベル D）。本発明者らが評価した方法によれば、最善選択性データセットにおいて発見された如何なる配列も膜貫通ヘリックス 7 本を有する蛋白質であり、そのほとんどがグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型である可能性が極めて高い。

### 〔実施例 3〕 遺伝子数の精密化

第一の段階において生成した配列から、表 1 に示す閾値を用いて GPCR 候補物質をスクリーニングした。しかしこれらの配列は、なおも以下の重複例を含んでいたため、最終的に候補数をより絞り込む必要があった。

ケース 1：同じ遺伝子の位置での完全なマッチまたは重なり。それらは 2 つの配列生成方法、すなわち（1）6-フレーム翻訳および（2）GeneDecoder による予測、の結果である。本発明者らはそれらを同じ遺伝子であると見なした。

ケース 2：異なる染色体間または同じ染色体上の異なる位置の間での多数のコピー。生物学的観点から、本発明者らはそれらを異なる遺伝子と見なした。重複遺伝子の最大数は染色体 2 と 11 とのあいだに多く認められた。

ケース 3：何らかの長い既知の配列に部分的にヒットする 2 つ以上の配列。これらが生成された理由は、遺伝子発見プログラムによるミスブライシングであると考えられる。本発明者らはそれらを本来は同じ遺伝子として融合するべきとした。

本発明者らは、上記の各ケースを検討することによってまず候補遺伝子の精度を上げた。具体的なアルゴリズムとして本発明者らは、染色体番号を C、フレーム番号を F およびゲノム配列上の位置を R として配列を S (C, F, R) と記述し、2 つの配列  $i, j$  が  $C_i = C_j$ 、 $F_i = F_j$ 、 $n_i = n_j$ 、 $e_i - t_j < 0$  ( $i < j$ ) で、50 残基以



上 99%以上の類似度でアラインされた場合に、2つの配列を同じ遺伝子である  
と見なした。(ここで  $n$  がコンティグ番号であって、 $t, e$  がコンティグ配列での  
 $N$  および  $C$  末端での相対的位置である場合、位置  $R=R(n, t, e)$  である)。

上記のような歸い分けを行った後、さらに、生物学的知見も加えて最終的に本  
発明者らは 883 および 2293 配列を含む最善選択性および最善感度データセット  
をそれぞれ得、さらにその他のレベルのデータセットも得た。各データセットに  
対して染色体ごとの GPCR 候補体の数を表 2 にまとめる。



表 2

染色体	level1A	level1B	level1C	level1D
1	90	133	150	190
2	44	80	93	119
3	53	79	95	142
4	17	39	43	65
5	24	53	69	100
6	53	70	80	111
7	45	82	90	111
8	21	28	32	50
9	33	50	56	72
10	15	28	38	58
11	249	343	353	386
12	32	74	88	138
13	10	19	28	51
14	41	54	60	79
15	16	23	32	69
16	15	30	49	77
17	38	52	59	76
18	8	23	26	39
19	53	84	88	114
20	7	18	22	34
21	0	4	4	8
22	5	9	12	19
X	14	24	26	47
Y	0	0	0	0
U	0	44	77	138
総計	883	1443	1670	2293



全てのレベルのデータセットにおいて染色体 11 は GPCR 候補体の最大数を有し、染色体 1、6、19 も多数の GPCR 候補体を示すことがわかる。一方、染色体 21 および Y では、GPCR 候補は極めて少ない。しかもこの傾向は、これまで毎月データを更新する過程でも変わらなかった。

最善選択性データセットに関するさらなる分析を表 3 に要約する。



表 3

ファミリー名	データ数
	計
Acetylcholine (muscarinic) receptors	12
Adenosine and adenine nucleotide receptors	17
Adrenergic Dopamine Serotonin receptors	38
Angiotensin receptors	5
Bradykinin receptors	3
Cannabinoids receptors	1
Chemokines and chemotactic factors receptors	31
Cholecystokinin / gastrin receptors	3
Endothelin receptors	2
Family 2 (B) receptors	20
Family 3 (C) receptors	30
Family fz/smo receptors	11
Glycoprotein hormones receptors	5
Histamine receptors	3
Melanocortins receptors	5
Melanotonin receptors	5
Neuropeptide Y receptors	7
Neurotensin receptors	6
no swissprot 7tm	16
Odorant/olfactory and gustatory receptors	537
Opioid peptides receptors	5
Opsins	6
Orphan receptors	76
Other receptors	4
Platelet activating factor receptors	3
Prostanoids receptors	8
Proteinase-activated receptors	5
Releasing hormones receptors	4
Somatostatin receptors	8
Tachykinin receptors	3
Vasopressin/oxytocin receptors	4
総計	883



本発明者らは、30%の配列類似性によって配列を分類した。これは一般的に、進化的に関連したファミリーの閾値であると考えられる。最大のファミリーは537メンバーを含む嗅覚受容体であった。20メンバー以上の主要なファミリーは、アドレナリン、ドーパミンおよびセロトニン受容体(38)、ファミリー2B受容体(20)、ファミリー3C受容体(30)ケモカインおよび化学遊走受容体(31)、ならびにオーファン受容体(76)であった。

#### [実施例4] 新規配列の抽出

配列をUNIGENE(Schuler, G. D. J. Mol. Med. 75, 694-698 (1997).)およびnr-aa(<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/README>)データベースに対して検索した。調べた配列中の少なくとも100残基以上が既知配列に対して連続してアラインされ、その領域のアミノ酸同一性が96%以上であれば、本発明者らはこの配列を既知の配列であると判断し、この基準で、本発明者らは、新規GPCR候補を得た。これらのデータセットは、定常的な再計算により、将来にわたり、維持、更新されるものである。

本発明者らは、抽出した新規配列を下記A群、B群、C群に分類した(表4から表6)。配列A群、B群、C群は、三重分析で得られた配列セットのうち、それぞれ最善選択性データセット(レベルA)、レベルBデータセット、レベルCデータセットを基にして個数の精密化を行った後、UNIGENEおよびnr-aaデータベースに対する検索に従って新規配列を求めたものである。



表 4

配列A群 (表1の最善選択性データセット (Level A)を基にした)

配列セット	解析アミノ酸	解析方法	新規遺伝子数
A-1	6 F 展開配列	相同性検索	277
A-2	G D 配列	相同性検索	136
A-3	6 F 展開配列+ G D 配列	モチーフ検索、 ドメイン検索	138

A-1 6 F配列を相同性検索にて解析した配列セット。(もともと簡易な方法の利用)

A-2 G D 配列の利用により、マルチエキソンからなるアミノ酸配列分が増加した。

A-3 モチーフ、ドメイン帰属の利用によって初めて発見された配列セット。

通常の配列検索では見出せない非常に遠いホモログを検出している。

表 5

配列B群 (表1のLevel Bを基にした)

配列セット	解析アミノ酸	解析方法	新規遺伝子数
B-1	6 F 展開配列	相同性検索	482
B-2	G D 配列	相同性検索	223
B-3	6 F 展開配列+ G D 配列	モチーフ検索、 ドメイン検索	283
B-4	6 F 展開配列+ G D 配列	膜貫通ヘリックス 予測	27

B-1 6 F配列を相同性検索にて解析した配列セット。(もともと簡易な方法の利用)

B-2 G D 配列の利用により、マルチエキソンからなるアミノ酸配列分が増加した。

B-3 モチーフ、ドメイン帰属の利用によって初めて発見された配列セット。

通常の配列検索では見出せない非常に遠いホモログを検出している。

B-4 膜貫通ヘリックス予測法の利用により初めて発見された配列セット。

通常の相同性検索モチーフ、ドメイン帰属でさえも見つからないような配列も発見している。



表 6

配列C群(表1のLevel Cを基にした)

配列セット	解析アミノ酸	解析方法	新規遺伝子数
C-1	6F展開配列	相同性検索	482
C-2	GD配列	相同性検索	223
C-3	6F展開配列+ GD配列	モチーフ検索、 ドメイン検索	287
C-4	6F展開配列+ GD配列	膜貫通ヘリックス 予測	223

C-1 6F配列を相同性検索にて解析した配列セット。(もともと簡易な方法の利用)

C-2 GD配列の利用により、マルチエキソンからなるアミノ酸配列分が増加した。

C-3 モチーフ、ドメイン帰属の利用によって初めて発見された配列セット。

通常の配列検索では見出せない非常に違いホモログを検出している。

C-4 膜貫通ヘリックス予測法の利用により初めて発見された配列セット。

通常の相同性検索モチーフ、ドメイン帰属でさえも見つからないような配列も発見している。

以下、本発明者が同定したクローンのうち、クローン 13434、10876、13860  
について解析を進めた。

#### [実施例5] クローン 13434、10876、13860 の単離

(1) クローン 13434 の cDNA は 5'-RACE、3'-RACE 法を用いて単離した。3'-端側の cDNA は 3'-RACE 法により、ヒト小腸由来の Marathon-Ready cDNA

(CLONTECH 社製) を鋳型とし、AP1 と 11518-①をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 11518-③をプライマーとして用いた。

また、ヒト小腸およびヒト大動脈由来の Marathon-Ready cDNA (CLONTECH 社製) を鋳型とした 3'-RACE 法においては、プライマーとして第一 PCR では AP1 と 11518-⑤を、第二 PCR においては AP2 と 11518-⑥をそれぞれ用いた。続いて、5'-端側の cDNA は 5'-RACE 法により、ヒト小腸由来の Marathon-Ready cDNA を鋳型とし、AP1 と 13434-②をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 11518-④をプライマーとして用いた。また、それぞれの PCR



においては TaKaRa ExTaq (宝酒造社製) を DNA ポリメラーゼとして用いた。これらの PCR により得られた DNA 断片は pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) に挿入した後、塩基配列の決定を行った。

(2) クローン 10876 の cDNA は同様に 5'-RACE、3'-RACE 法を用いて単離した。3'-端側の cDNA は 3'-RACE 法により、ヒト胎盤由来の Marathon-Ready cDNA (CLONTECH 社製) を鋳型とし、AP1 と 3' R10876 をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 3' R10876-nest をプライマーとして用いた。続いて、5'-端側の cDNA は 5'-RACE 法により、ヒト胎盤由来の Marathon-Ready cDNA を鋳型とし、AP1 と 5' R10876 をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 5' R10876-nest をプライマーとして用いた。また、それぞれの PCR においては Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH 社製) を DNA ポリメラーゼとして用いた。これらの PCR により得られた DNA 断片は pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) に挿入した後、塩基配列の決定を行った。

(3) クローン 13860 の cDNA は同様に 5'-RACE、3'-RACE 法を用いて単離した。3'-端側の cDNA は 3'-RACE 法により、H.Hela 細胞由来の Marathon-Ready cDNA (CLONTECH 社製) を鋳型とし、AP1 と 3' R13860 をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 3' R13860-nest をプライマーとして用いた。続いて、5'-端側の cDNA は 5'-RACE 法により、H.Hela 細胞由来の Marathon-Ready cDNA を鋳型とし、AP1 と 5' R13860 をプライマーとして第一 PCR を行い、さらに第二 PCR においては AP2 と 5' R13860-nest をプライマーとして用いた。また、それぞれの PCR においては Advantage 2 Polymerase Mix (CLONTECH 社製) を DNA ポリメラーゼとして用いた。これらの PCR により得られた DNA 断片は pGEM-T Easy ベクター (Promega 社製) に挿入した後、塩基配列の決定を行った。



## &lt;プライマー配列&gt;

---

3' R10876	AGATCAATAAAACCCGCAATGCCAG (配列番号: 7)
3' R10876-nest	AGGAGATGGGATGAGAAAGCGTGC (配列番号: 8)
5' R10876	AACCACACATTGGCAGTCAGAAGG (配列番号: 9)
5' R10876-nest	GCTTAGGATTGAGACGCTGAGCC (配列番号: 10)
3' R13860	CTGCCTTGCTGCCGCTTCCTC (配列番号: 11)
3' R13860-nest	GCTGGCAAAGCACCGAGTTCTC (配列番号: 12)
5' R13860	TAGTACCAGCCCATTCACGCCTATG (配列番号: 13)
5' R13860-nest	AGGTAGAGCCCGAGGGTGACAC (配列番号: 14)
10875-①	ACTCCAGCAAGCTGTTTGCA (配列番号: 15)
10875-②	GACTTGGGCAAGGTATGGAAA (配列番号: 16)
10875-③	GTAGGCCTGGGCATTTCTATTTGCA (配列番号: 17)
10875-④	CCACACATCCCTTGTGGTGTGTAT (配列番号: 18)
11518-①	GGCCGTCATGAACATACATTT (配列番号: 19)
11518-③	CAACGGGCTGGTCTCTGGTTTTTC (配列番号: 20)
11518-④	GAGGCTCACGCCGGTAAGGAACATG (配列番号: 21)
13434-②	CCTCCCGGCCAGGAAGTAGA (配列番号: 22)
11518-⑤	TCCATCTACTTAGGGATCGACTGG (配列番号: 23)
11518-⑥	ATCTGCATCAACAGCAGCGCCAAG (配列番号: 24)
AP1	CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (配列番号: 25)
AP2	ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC (配列番号: 26)

---



なお、上記（１）から（３）において、Advantage 2 Polymerase Mix（CLONTECH 社製）を用いた PCR 反応は Marathon Ready cDNA に添付の方法に従い行った。また TaKaRa ExTaq を用いた PCR 反応は以下の条件で行った。すなわち、第一 PCR においては反応液 50  $\mu$ L 中に 5  $\mu$ L の 10 x ExTaq buffer、4  $\mu$ L の dNTP Mixture (2.5 mM each)、1  $\mu$ L のセンスプライマー (10  $\mu$ M) ならびにアンチセンスプライマー (10  $\mu$ M)、5  $\mu$ L の Marathon-Ready cDNA、0.5  $\mu$ L の TaKaRa ExTaq、ならびに 0.5  $\mu$ L の TaqStart Antibody をそれぞれ含むよう調製した後、96°C で 30 秒インキュベートした後、96°C で 30 秒、72°C で 4 分の反応からなるサイクルを 5 回、96°C で 30 秒、70°C で 4 分の反応からなるサイクルを 5 回、さらに 96°C で 20 秒、68°C で 4 分の反応からなるサイクルを 25 回行った。また、第二 PCR においては、第一 PCR の反応液 5  $\mu$ L を鋳型として用いた以外は第一 PCR と同様の条件にて行った。

[実施例 6] クローン 13434、10876、13860 の発現解析

クローン 13434、10876、13860 のヒト各臓器ならびに腫瘍組織における mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。鋳型としては Multiple Tissue cDNA (MTC) Panels (Human I、Human II、Human Tumor、CLONTECH 社製) をそれぞれ用い、以下の PCR 条件で目的のクローンを増幅した。

クローン 13434 においては、プライマーとして 13434-1 「CTCCAAGACCCCTTCGCCT (配列番号：27)」と 13434-2 「GTCTCCCAGCCACCCCT (配列番号：28)」を用い、94°C で 1 分反応させた後、「94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 30 秒」からなるサイクルを 35 サイクル行った。

クローン 10876 においては、プライマーとして、10876-1 「GAGTCTCCCAGACAGGTAAA (配列番号：29)」と 10876-2 「ACCAACATATTGGCAGTCAGAA (配列番号：30)」を用い、94°C で 1 分反応させた



後、「94℃で 30 秒、56℃で 30 秒、72℃で 30 秒」からなるサイクルを 40 サイクル行った。

クローン 13860 においては、プライマーとして、13860-1  
「CTCACTGGTCTTCTGGGAT (配列番号：3 1)」と 13860-2  
「TCTTGTTCGCCACCACGAC (配列番号：3 2)」を用い、94℃で 1 分反応させた後、  
「94℃で 30 秒、56℃で 30 秒、72℃で 30 秒」からなるサイクルを 40 サイクル  
行った。

その結果、クローン 13434 は骨格筋、白血球以外の多くのヒト正常臓器で mRNA が発現しているのに対し、今回検討したいずれのヒト癌組織においても mRNA の発現が極端に減少していた。また、クローン 10876 は腎臓、ならびにくつつかの癌組織において発現量が少なかったが、今回検討したほぼ全ての臓器において発現が認められた。また、クローン 13860 は脳、小腸、大腸において発現が高いことが明らかになった。

以上の結果より、これら 3 つのクローンがコードする GPCR は mRNA の発現が認められた各種臓器において恒常性の維持などの生理機能をしている可能性が考えられ、さらに正常組織に比べ癌組織において発現の低下が認められたことより、癌化のステップに関与する可能性も考えられた。

### 産業上の利用の可能性

本発明により、新規な GPCR、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該ポリペプチドの製造方法が提供された。さらに、該ポリペプチドに結合するあるいはその活性を修飾する化合物の同定方法が提供された。本発明のポリペプチドやポリヌクレオチド、または本発明のポリペプチドに結合若しくはその活性を修飾する化合物は、本発明のポリペプチドが関連する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。さらに本発明によって、本発明のポリペプチドをコードす



る遺伝子の変異や発現を検出することを含む疾患の検査方法が提供された。

GPCR は医薬品開発や医療の分野において最も重要かつ注目されている分子の一つであり、本発明において新規 GPCR が網羅的に提供されたことにより、これら分野の飛躍的な発展が期待される。GPCR の研究者にとっても、本発明は貴重な情報源となろう。



## 請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型の受容体をコードする下記  
(a) から (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。  
(a) 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド  
(b) 配列番号：1、3または5に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド  
(c) 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド  
(d) 配列番号：1、3または5に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド
2. 配列番号：2、4または6に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド。
3. 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
4. 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3に記載のベクターを保持する宿主細胞。
5. 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。
6. 請求項4に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項5に記載のポリペプチドの製造方法。
7. 請求項5に記載のポリペプチドに結合する抗体。
8. 請求項5に記載のポリペプチドに対するリガンドの同定方法であって、



(a) 請求項 5 に記載のポリペプチドまたは請求項 5 に記載のポリペプチドを発現している細胞若しくはその細胞膜と候補化合物とを接触させる工程、および

(b) 候補化合物が請求項 5 に記載のポリペプチドまたは請求項 5 に記載のポリペプチドを発現している細胞若しくはその細胞膜に結合するかどうかを検出する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載のポリペプチドに対するアゴニストの同定方法であって、

(a) 請求項 5 に記載のポリペプチドを発現している細胞と候補化合物とを接触させる工程、および

(b) 候補化合物が請求項 5 に記載のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルを発生させるかどうかを検出する工程、を含む方法。

10. 請求項 5 に記載のポリペプチドに対するアンタゴニストの同定方法であって、

(a) 候補化合物の存在下で請求項 5 に記載のポリペプチドを発現している細胞と請求項 5 に記載のポリペプチドに対するアゴニストとを接触させる工程、および

(b) 候補化合物の非存在下で検出した場合と比較して、請求項 5 に記載のポリペプチドの活性化の指標となるシグナルが減少するかどうかを検出する工程、を含む方法。

11. 請求項 8 に記載の方法により同定されたりガンド。

12. 請求項 9 に記載の方法により同定されたアゴニスト。

13. 請求項 10 に記載の方法により同定されたアンタゴニスト。

14. 請求項 8 から 10 に記載の方法に用いるためのキットであって、下記

(a) または (b) に記載の少なくとも一つの分子を含むキット。

(a) 請求項 5 に記載のポリペプチド

(b) 請求項 4 に記載の宿主細胞またはその細胞膜



15. 請求項5に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記(a)から(c)に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

(a) 請求項5に記載のポリペプチドに対するアゴニスト

(b) 請求項1または2に記載のポリヌクレオチド

(c) 請求項3に記載のペクター

16. 請求項5に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記(a)または(b)に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

(a) 請求項5に記載のポリペプチドに対するアンタゴニスト

(b) 生体内において、内因性の請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

17. 請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項5に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法。

18. 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項17に記載の検査方法。

(a) 被検者からDNA試料を調製する工程

(b) 請求項5に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を単離する工程

(c) 単離したDNAの塩基配列を決定する工程

(d) 工程(c)により決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程。

19. 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項17に記載の検査方法。

(a) 被検者からDNA試料を調製する工程

(b) 調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程

(c) DNA断片をその大きさに応じて分離する工程



(d) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

20. 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、請求項 17 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を制限酵素により切断する工程

(d) DNA 断片をその大きさに応じて分離する工程

(e) 検出された DNA 断片の大きさを、対照と比較する工程

21. 以下の (a) ~ (e) の工程を含む、請求項 17 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を一本鎖 DNA に解離させる工程

(d) 解離させた一本鎖 DNA を非変性ゲル上で分離する工程

(e) 分離した一本鎖 DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

22. 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、請求項 17 に記載の検査方法。

(a) 被検者から DNA 試料を調製する工程

(b) 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を増幅する工程

(c) 増幅した DNA を、DNA 変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程

(d) 分離した DNA のゲル上での移動度を対照と比較する工程

23. 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法。

24. 以下の (a) ~ (c) の工程を含む、請求項 23 に記載の検査方法。

(a) 被検者から RNA 試料を調製する工程



(b) 該 RNA 試料に含まれる請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする RNA の量を測定する工程

(c) 測定された RNA の量を対照と比較する工程

25. 以下の (a) ~ (d) の工程を含む、請求項 23 に記載の検査方法。

(a) 被検者から調製した cDNA 試料、および請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA とハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(b) 該 cDNA 試料と該基板を接触させる工程

(c) 該 cDNA 試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該 cDNA 試料に含まれる請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程

(d) 測定された請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程

26. 以下の (a) ~ (c) の工程を含む、請求項 23 に記載の検査方法。

(a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる請求項 5 に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

27. 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

28. 請求項 27 に記載のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項 5 に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。



29. 請求項7に記載の抗体を含む、請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項5に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

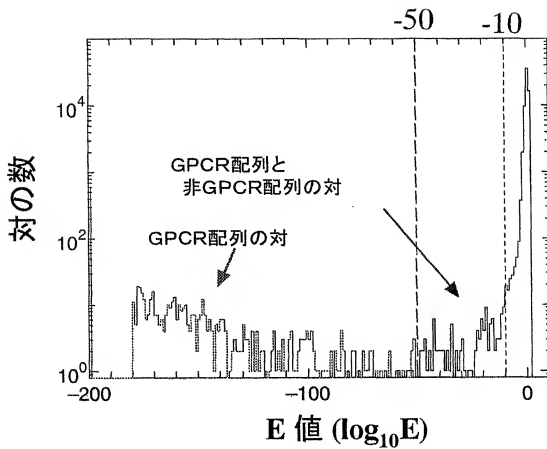
30. 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドが導入された哺乳動物。

31. 内因性の請求項1に記載のポリヌクレオチドの発現が人為的に抑制された哺乳動物。

32. マウスである、請求項30または31に記載の哺乳動物。



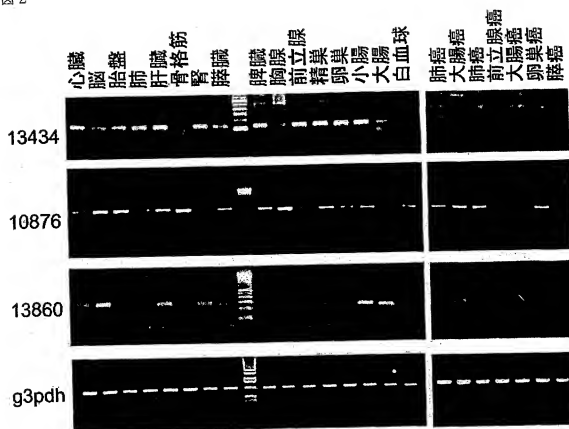
図 1





2 / 3

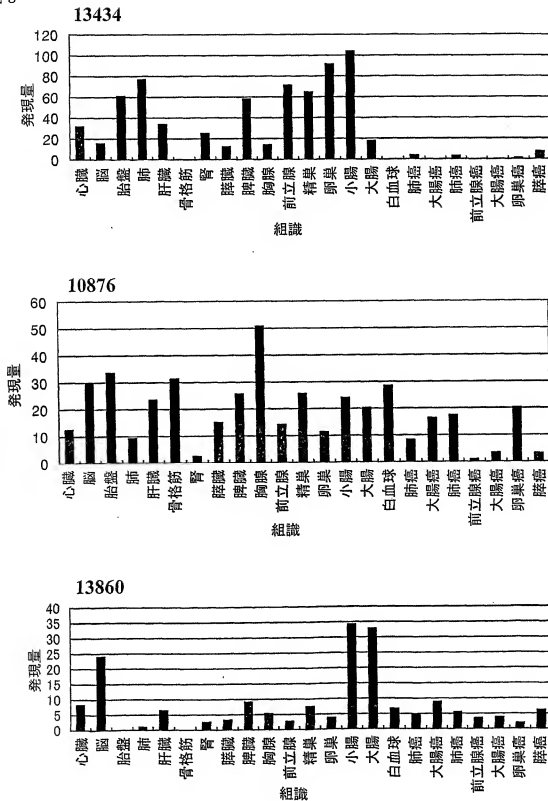
図 2





3 / 3

图 3





1 / 5 2

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology  
Center for Advanced Science and Technology Incubation, Ltd.

<120> Guanosine triphosphate-binding protein coupled receptors

<130> A3-X0101P2

<140>

<141>

<150> JP 2001-246789

<151> 2001-06-18

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2120

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>



2 / 5 2

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1215)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13434

&lt;400&gt; 1

cta ttt tcc aag gct ccg ggc cgc gct cgg cgc tgg cct get gcc ccg 48

Leu Phe Ser Lys Ala Pro Gly Arg Ala Arg Arg Trp Pro Ala Ala Pro

1 5 10 15

gcg ggt ccg ccg gcc gga ggc ggg agt cac agg aag agc cct cca caa 96

Ala Gly Pro Pro Ala Gly Gly Gly Ser His Arg Lys Ser Pro Pro Gln

20 25 30

aag gag gcc tcg gcg gat cag gac agc tgc agg trg gtg tgc aga ctg 144

Lys Glu Ala Ser Ala Asp Gln Asp Ser Cys Arg Xaa Val Cys Arg Leu

35 40 45

gtg agc tgc agc agg ggc cca gac gcg cca ggc ctg gag atg gct gga 192

Val Ser Cys Ser Arg Gly Pro Asp Ala Pro Gly Leu Glu Met Ala Gly

50 55 60

aac tgc tcc tgg gag gcc cat ccc ggc aac agg aac arg atg tgc cct 240

Asn Cys Ser Trp Glu Ala His Pro Gly Asn Arg Asn Xaa Met Cys Pro

65 70 75 80



3 / 5 2

ggc ctg agc gag gcc ccg gaa ctc tac agc cgg ggc ttc ctg acc atc 288

Gly Leu Ser Glu Ala Pro Glu Leu Tyr Ser Arg Gly Phe Leu Thr Ile

85

90

95

gag cag atc gcg atg ctg ccg cct ccg gcc gtc atg aac tac atc ttc 336

Glu Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Pro Ala Val Met Asn Tyr Ile Phe

100

105

110

ctg ctc ctc tgc ctg tgt ggc ctg gtg ggc aac ggg ctg gtc ctc tgg 384

Leu Leu Leu Cys Leu Cys Gly Leu Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Trp

115

120

125

ttt ttc ggc ttc tcc atc aag agg aac ccc ttc tcc atc tac ttc ctg 432

Phe Phe Gly Phe Ser Ile Lys Arg Asn Pro Phe Ser Ile Tyr Phe Leu

130

135

140

cac ctg gcc agc gcc gat gtg ggc tac ctc ttc agc aag gcg gtg ttc 480

His Leu Ala Ser Ala Asp Val Gly Tyr Leu Phe Ser Lys Ala Val Phe

145

150

155

160

ttc atc ctg aac acg ggg ggc ttc ctg ggc acg ttt gcc gac tac atc 528

Ser Ile Leu Asn Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Phe Ala Asp Tyr Ile

165

170

175

cgc agc gtg tgc cgg gtc ctg ggg ctc tgc atg ttc ctt acc ggc gtg 576



4 / 5 2

Arg Ser Val Cys Arg Val Leu Gly Leu Cys Met Phe Leu Thr Gly Val

180

185

190

agc ctc ctg ccg gcc gtc agc gcc gag cgc tgc gcc tgc gtc atc ttc 624

Ser Leu Leu Pro Ala Val Ser Ala Glu Arg Cys Ala Ser Val Ile Phe

195

200

205

ccc gcc tgg tac tgg cgc cgg cgg ccc aag cgc ctg tgc gcc gtg gtg 672

Pro Ala Trp Tyr Trp Arg Arg Arg Pro Lys Arg Leu Ser Ala Val Val

210

215

220

tgc gcc ctg ctg tgg gtc ctg tcc ctc ctg gtc acc tgc ctg cac aac 720

Cys Ala Leu Leu Trp Val Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys Leu His Asn

225

230

235

240

tac ttc tgc gtg ttc ctg ggc cgc ggg gcc ccc ggc ggc gcc tgc agg 768

Tyr Phe Cys Val Phe Leu Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ala Ala Cys Arg

245

250

255

cac atg gac atc ttc ctg ggc atc ctc ctg ttc ctg ctc tgc tgc ccg 816

His Met Asp Ile Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Leu Cys Cys Pro

260

265

270

ctc atg gtg ctg ccc tgc ctg gcc ctc atc ctg cac gtg gag tgc cgg 864

Leu Met Val Leu Pro Cys Leu Ala Leu Ile Leu His Val Glu Cys Arg

275

280

285



5 / 5 2

gcc cga cgg cgc cag cgc tct gcc aag ctc aac cac gtc atc ctg gcc 912  
 Ala Arg Arg Arg Gln Arg Ser Ala Lys Leu Asn His Val Ile Leu Ala  
 290 295 300

atg gtc tcc gtc ttc ctg gtg tcc tcc atc tac tta ggg atc gac tgg 960  
 Met Val Ser Val Phe Leu Val Ser Ser Ile Tyr Leu Gly Ile Asp Trp  
 305 310 315 320

ttc ctc ttc tgg gtc ttc cag atc ccg gcc ccc ttc ccc gag tac gtc 1008  
 Phe Leu Phe Trp Val Phe Gln Ile Pro Ala Pro Phe Pro Glu Tyr Val  
 325 330 335

act gac ctg tgc atc tgc atc aac agc agc gcc aag ccc atc gtc tac 1056  
 Thr Asp Leu Cys Ile Cys Ile Asn Ser Ser Ala Lys Pro Ile Val Tyr  
 340 345 350

ttc ctg gcc ggg agg gac aag tcg cag cgg ctg tgg gag ccg ctc agg 1104  
 Phe Leu Ala Gly Arg Asp Lys Ser Gln Arg Leu Trp Glu Pro Leu Arg  
 355 360 365

gtg gtc ttc cag cgg gcc ctg cgg gac ggc gct gag ctg ggg gag gcc 1152  
 Val Val Phe Gln Arg Ala Leu Arg Asp Gly Ala Glu Leu Gly Glu Ala  
 370 375 380

ggg ggc agc acg ccc aac aca gtc acc atg gag atg cag tgt ccc ccg 1200



6 / 5 2

Gly Gly Ser Thr Pro Asn Thr Val Thr Met Glu Met Gln Cys Pro Pro

385

390

395

400

ggg aac gcc tcc tga gactccagcg cctggaggag gcaggggcag gaagcggcct 1255

Gly Asn Ala Ser

ccaagaccct tcgccttggg acaggaatgg gcacctgctt ctgagtcctat acaggagaag 1315

aaagatctgt ttctctctct cgggcctect tctccctggg ctggggactc caggggtggc 1375

tgggagactg ggcagccacc agcaaacaga cctgttgccc cctgcccgcc tccccaccc 1435

attctgcctc cctagagacc tctgtacag aagttgcccc caggtggtgg ggccccctct 1495

tgccctaggc tggttggtaa aagagaggag gtcaacaccc agcctagcca cctctgcctc 1555

ttgggtcagc cctccttgac tgtgtccag ccagcaccag gccagcagcc tcatecctgc 1615

cattcagggc tgttccagag attcgatcct ctttaaggcat tatcagtga caaatgtgaa 1675

ggaaatggtg tctggaagaa agttctggtt cacatgcctt gtagetaagt ctttctgcaa 1735

acaacctccc ttccccccgt cgagtcattt ggtgactttg atgggggat ttctggttat 1795

gtcaaggctc tggagacagg aagggccttt ggccgccttg gtagttgac ctgccttttc 1855



7 / 5 2

tgactccggg acgagccagt cctaggctgc ctccgggagc acttgaggta tcccgcaggc 1915  
catgaggacc cactgggcag ctctggaca gcctcttggc tccagcccc acccgaaagt 1975  
ggacactggc tcgccttgg ccacctgggg actggcactg tgggtcacag tggcccaatg 2035  
tgccaacgg aagttttata aaagacaaaa tgtatatcaa taaacatttt ataacttgca 2095  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 2120

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 404

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (44)

&lt;223&gt; "Xaa" = STOP or Trp

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (77)

&lt;223&gt; "Xaa" = Lys or Arg



8/52

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13434

&lt;400&gt; 2

Leu Phe Ser Lys Ala Pro Gly Arg Ala Arg Arg Trp Pro Ala Ala Pro  
1 5 10 15  
Ala Gly Pro Pro Ala Gly Gly Gly Ser His Arg Lys Ser Pro Pro Gln  
20 25 30  
Lys Glu Ala Ser Ala Asp Gln Asp Ser Cys Arg Xaa Val Cys Arg Leu  
35 40 45  
Val Ser Cys Ser Arg Gly Pro Asp Ala Pro Gly Leu Glu Met Ala Gly  
50 55 60  
Asn Cys Ser Trp Glu Ala His Pro Gly Asn Arg Asn Xaa Met Cys Pro  
65 70 75 80  
Gly Leu Ser Glu Ala Pro Glu Leu Tyr Ser Arg Gly Phe Leu Thr Ile  
85 90 95  
Glu Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Pro Ala Val Met Asn Tyr Ile Phe  
100 105 110  
Leu Leu Leu Cys Leu Cys Gly Leu Val Gly Asn Gly Leu Val Leu Trp  
115 120 125  
Phe Phe Gly Phe Ser Ile Lys Arg Asn Pro Phe Ser Ile Tyr Phe Leu  
130 135 140  
His Leu Ala Ser Ala Asp Val Gly Tyr Leu Phe Ser Lys Ala Val Phe  
145 150 155 160  
Ser Ile Leu Asn Thr Gly Gly Phe Leu Gly Thr Phe Ala Asp Tyr Ile



9 / 5 2

165	170	175
Arg Ser Val Cys Arg Val Leu Gly Leu Cys Met Phe Leu Thr Gly Val		
180	185	190
Ser Leu Leu Pro Ala Val Ser Ala Glu Arg Cys Ala Ser Val Ile Phe		
195	200	205
Pro Ala Trp Tyr Trp Arg Arg Arg Pro Lys Arg Leu Ser Ala Val Val		
210	215	220
Cys Ala Leu Leu Trp Val Leu Ser Leu Leu Val Thr Cys Leu His Asn		
225	230	235
Tyr Phe Cys Val Phe Leu Gly Arg Gly Ala Pro Gly Ala Ala Cys Arg		
245	250	255
His Met Asp Ile Phe Leu Gly Ile Leu Leu Phe Leu Leu Cys Cys Pro		
260	265	270
Leu Met Val Leu Pro Cys Leu Ala Leu Ile Leu His Val Glu Cys Arg		
275	280	285
Ala Arg Arg Arg Gln Arg Ser Ala Lys Leu Asn His Val Ile Leu Ala		
290	295	300
Met Val Ser Val Phe Leu Val Ser Ser Ile Tyr Leu Gly Ile Asp Trp		
305	310	315
Phe Leu Phe Trp Val Phe Gln Ile Pro Ala Pro Phe Pro Glu Tyr Val		
325	330	335
Thr Asp Leu Cys Ile Cys Ile Asn Ser Ser Ala Lys Pro Ile Val Tyr		
340	345	350
Phe Leu Ala Gly Arg Asp Lys Ser Gln Arg Leu Trp Glu Pro Leu Arg		
355	360	365
Val Val Phe Gln Arg Ala Leu Arg Asp Gly Ala Glu Leu Gly Glu Ala		



10/52

370						375								380					
Gly	Gly	Ser	Thr	Pro	Asn	Thr	Val	Thr	Met	Glu	Met	Gln	Cys	Pro	Pro				
385						390					395					400			
Gly	Asn	Ala	Ser																

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 3230

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (294)..(2381)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3096)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3111)

&lt;223&gt; "n" = unknown



11 / 52

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3129)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3139)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3145)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3148)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3168)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;



1 2 / 5 2

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3186)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3195)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3205)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (3224)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 10876

&lt;400&gt; 3

cccatattcaa aaatggagaa gacagatcac agccactgac caggaccgt gggaggtgcc 60

acgtgatggt gaggcatcat gctaggagc tgagctctga ccttctctgt gagtattct 120



13/52

ccacctctgg gctgctagat ctacttcctg gatgccagtt tcactcttat tgccaggctg 180

gagtgcaatg gtgcaatccc agctcactgc aacctctgcc tcccaggcca agcgattga 240

ttctctgct tccgcttcca agtagctggc attataggtg aagatctca tgt atg 296

Met

1

aaa atg aag tcc cag gca acc atg att tgc tgc tta gtg ttc ttt ctg 344

Lys Met Lys Ser Gln Ala Thr Met Ile Cys Cys Leu Val Phe Phe Leu

5

10

15

tcc aca gaa tgt tcc cac tat aga tcc aag att cac cta aaa gct gga 392

Ser Thr Glu Cys Ser His Tyr Arg Ser Lys Ile His Leu Lys Ala Gly

20

25

30

gat aaa ctt caa agc cct gaa ggg aaa ccc aag act gga agg atc caa 440

Asp Lys Leu Gln Ser Pro Glu Gly Lys Pro Lys Thr Gly Arg Ile Gln

35

40

45

gag aaa tgc gaa gga cct tgt att tct tct tcc aac tgc agc cag ccc 488

Glu Lys Cys Glu Gly Pro Cys Ile Ser Ser Ser Asn Cys Ser Gln Pro

50

55

60

65

tgt gct aag gac ttt cat gga gaa ata gga ttt aca tgt aat caa aaa 536



1 4 / 5 2

Cys Ala Lys Asp Phe His Gly Glu Ile Gly Phe Thr Cys Asn Gln Lys

70

75

80

aag tgg caa aaa tca gct gaa aca tgt aca agc ctt tct gtg gaa aaa 584

Lys Trp Gln Lys Ser Ala Glu Thr Cys Thr Ser Leu Ser Val Glu Lys

85

90

95

ctc ttt aag gac tca act ggt gca tct cgc ctt tct gta gca gca cca 632

Leu Phe Lys Asp Ser Thr Gly Ala Ser Arg Leu Ser Val Ala Ala Pro

100

105

110

tct ata cct ctg cat att cya gac ttt cgw gct cca gag acc att gag 680

Ser Ile Pro Leu His Ile Xaa Asp Phe Xaa Ala Pro Glu Thr Ile Glu

115

120

125

agt gta gct caa gga atc cgt aag aac tgc ccc ttt gat tat gcc tgy 728

Ser Val Ala Gln Gly Ile Arg Lys Asn Cys Pro Phe Asp Tyr Ala Cys

130

135

140

145

atc acw gac atg gtg aaa tca tca gaa aca aca tct gga aat att gca 776

Ile Xaa Asp Met Val Lys Ser Ser Glu Thr Thr Ser Gly Asn Ile Ala

150

155

160

ttt ata gtg gag tya tta aaa aat att tct aca gac ttg tct gat aat 824

Phe Ile Val Glu Xaa Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Leu Ser Asp Asn

165

170

175



15 / 52

gtt act cga gag aaa atg aag agc tat agt gaa gtg gcc aac cac atc 872  
 Val Thr Arg Glu Lys Met Lys Ser Tyr Ser Glu Val Ala Asn His Ile  
 180 185 190

ctc gac aca gca gcc att tca aac tgg gct ttc att ccc aac aaa aat 920  
 Leu Asp Thr Ala Ala Ile Ser Asn Trp Ala Phe Ile Pro Asn Lys Asn  
 195 200 205

gcc agc tcg gat ttg ttg cag tca gtg aat ttg ttt gcc aga caa ctc 968  
 Ala Ser Ser Asp Leu Leu Gln Ser Val Asn Leu Phe Ala Arg Gln Leu  
 210 215 220 225

cac atc cac aat aat tct gag aac att gtg aat gaa ctc ttc att cag 1016  
 His Ile His Asn Asn Ser Glu Asn Ile Val Asn Glu Leu Phe Ile Gln  
 230 235 240

aca aaa ggg ttt cac atc aac cat aat acc tca gag aaa agc ctc aat 1064  
 Thr Lys Gly Phe His Ile Asn His Asn Thr Ser Glu Lys Ser Leu Asn  
 245 250 255

ttc tcc atg agc atg aac aat acc aca gaa gat atc tta gga atg gta 1112  
 Phe Ser Met Ser Met Asn Asn Thr Thr Glu Asp Ile Leu Gly Met Val  
 260 265 270

cag att ccc agg caa gag cta agg aag ctg tgg cca aat gca tcc caa 1160



16 / 52

Gln Ile Pro Arg Gln Glu Leu Arg Lys Leu Trp Pro Asn Ala Ser Gln

275

280

285

gcc att agc ata gct ttc cca acc ttg ggg gct atc ctg aga gaa gcc 1208

Ala Ile Ser Ile Ala Phe Pro Thr Leu Gly Ala Ile Leu Arg Glu Ala

290

295

300

305

cac ttg caa aat gtg agt ctt ccc aga cag gta aat ggt ctg gtg cta 1256

His Leu Gln Asn Val Ser Leu Pro Arg Gln Val Asn Gly Leu Val Leu

310

315

320

tca gtg gtt tta cca gaa agg ttg caa gaa atc ata ctc acc ttc gaa 1304

Ser Val Val Leu Pro Glu Arg Leu Gln Glu Ile Ile Leu Thr Phe Glu

325

330

335

aag atc aat aaa acc cgc aat gcc aga gcc cag tgt gtt ggc tgg cac 1352

Lys Ile Asn Lys Thr Arg Asn Ala Arg Ala Gln Cys Val Gly Trp His

340

345

350

tcc aag aaa agg aga tgg gat gag aaa gcg tgc caa atg atg ttg gat 1400

Ser Lys Lys Arg Arg Trp Asp Glu Lys Ala Cys Gln Met Met Leu Asp

355

360

365

atc agg aac gaa gtg aaa tgc cgc tgt aac tac acc agt gtg gtg atg 1448

Ile Arg Asn Glu Val Lys Cys Arg Cys Asn Tyr Thr Ser Val Val Met

370

375

380

385



17/52

tct ttt tcc att ctc atg tcc tcc aaa tcg atg acc gac aaa gtt ctg 1496  
 Ser Phe Ser Ile Leu Met Ser Ser Lys Ser Met Thr Asp Lys Val Leu  
 390 395 400

gac tac atc acc tgc att ggg ctc agc gtc tca atc cta agc ttg gtt 1544  
 Asp Tyr Ile Thr Cys Ile Gly Leu Ser Val Ser Ile Leu Ser Leu Val  
 405 410 415

ctt tgc ctg atc att gaa gcc aca gtg tgg tcc cgg gtg gtt gtg acg 1592  
 Leu Cys Leu Ile Ile Glu Ala Thr Val Trp Ser Arg Val Val Val Thr  
 420 425 430

gag ata tca tac atg cgt cac gtg tgc atc gtg aat ata gca gtg tcc 1640  
 Glu Ile Ser Tyr Met Arg His Val Cys Ile Val Asn Ile Ala Val Ser  
 435 440 445

ctt ctg act gcc aat gtg tgg ttt atc ata ggc tct cac ttt aac att 1688  
 Leu Leu Thr Ala Asn Val Trp Phe Ile Ile Gly Ser His Phe Asn Ile  
 450 455 460 465

aag gcc cag gac tac aac atg tgt gtt gca gtg aca ttt ttc agc cac 1736  
 Lys Ala Gln Asp Tyr Asn Met Cys Val Ala Val Thr Phe Phe Ser His  
 470 475 480

ttt ttc tac ctc tct ctg ttt ttc tgg atg ctc ttc aaa gca ttg etc 1784



1 8 / 5 2

Phe Phe Tyr Leu Ser Leu Phe Phe Trp Met Leu Phe Lys Ala Leu Leu

485

490

495

atc att tat gga ata ttg gtc att ttc cgt agg atg atg aag tcc cga 1832

Ile Ile Tyr Gly Ile Leu Val Ile Phe Arg Arg Met Met Lys Ser Arg

500

505

510

atg atg gtc att ggc ttt gcc att ggc tat ggg tgc cca ttg atc att 1880

Met Met Val Ile Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Gly Cys Pro Leu Ile Ile

515

520

525

gct gtc act aca gtt gct atc aca gag cca gag aac ggc tac atg aga 1928

Ala Val Thr Thr Val Ala Ile Thr Glu Pro Glu Asn Gly Tyr Met Arg

530

535

540

545

cct gag gcc tgt tgg ctt aac tgg gac aat acc aaa gcc ctt tta gca 1976

Pro Glu Ala Cys Trp Leu Asn Trp Asp Asn Thr Lys Ala Leu Leu Ala

550

555

560

ttt gcc atc ccg gcg ttc gtc att gtg gct gta aat ctg att gtg gtt 2024

Phe Ala Ile Pro Ala Phe Val Ile Val Ala Val Asn Leu Ile Val Val

565

570

575

ttg gtt gtt gct gtc aac act cag agg ccc tct att ggc agt tcc aag 2072

Leu Val Val Ala Val Asn Thr Gln Arg Pro Ser Ile Gly Ser Ser Lys

580

585

590



19/52

tct cag gat gtg gyc ata att atg agg atc agc aaa aat gtt gcc atc	2120
Ser Gln Asp Val Xaa Ile Ile Met Arg Ile Ser Lys Asn Val Ala Ile	
595	600
605	
ctc act cca ctg ctg gga ctg acc tgg ggt ttt gga ata gcc act ctc	2168
Leu Thr Pro Leu Leu Gly Leu Thr Trp Gly Phe Gly Ile Ala Thr Leu	
610	615
620	625
ata gaa ggc act tcc ttg acg ttc cat ata att ttt gcc ttg ctc aat	2216
Ile Glu Gly Thr Ser Leu Thr Phe His Ile Ile Phe Ala Leu Leu Asn	
630	635
640	
gct ttc cag ggt ttt ttc atc ctg ctg ttt gga acc att atg gat cac	2264
Ala Phe Gln Gly Phe Phe Ile Leu Leu Phe Gly Thr Ile Met Asp His	
645	650
655	
aag ata aga gat gct ttg agg atg agg atg tct tca ctg aag ggg aaa	2312
Lys Ile Arg Asp Ala Leu Arg Met Arg Met Ser Ser Leu Lys Gly Lys	
660	665
670	
tcg agg gca gct gag aat gca tca cta ggc cca acc aat gga tct aaa	2360
Ser Arg Ala Ala Glu Asn Ala Ser Leu Gly Pro Thr Asn Gly Ser Lys	
675	680
685	
tta atg aat cgt caa gga tga aatgctgccc catttctcat ggatgtctctg	2411



20/52

Leu Met Asn Arg Gln Gly

690

695

agaccaagag gggagatcca ggagaaagag gccatggaaa gcaggtgga gtgaggaga 2471

atggtcatgc ttccttgaa gactttctct tctgtcagg agtgactccc aagctcttg 2531

tcggccgaag aaaactgag gataacattt gctgactggg cttaaggag catgattat 2591

ggaccacctta acctaccgt gccctgcaag aggtggctt cttggtcaat cttgactaga 2651

ttaagagta atctcaagc cattttatgg tctcctggc cagctggggg ctgtagggc 2711

ctgctgggct tggctgtctt tcaactctga ggctgtctt gtggtccat agctcagtc 2771

tccatcactc tgcgtggatc ctgggtactt tggacagtga gggttcgatc caattttagg 2831

ggtagggttg ggggtgggag tgggagtg ggttggcagg aggaagaatg agtctacttt 2891

ggagacaatt aagtcattgt acgtttccta aagataggga actggaagaa aagcaagaga 2951

actgtttaat atgctagatt attttagtct tattttagac ctgagtaaa ctaatttagc 3011

ttctaggatc caagcttctt tatttgtgaa acaggawaaa aaaatwmwgg warraawaam 3071

kwkwsksgys kytgaattta ctgcncaagt tigtgttgn gtatatgagt cttttaanaa 3131



2 1 / 5 2

tcctatanat aganaaanatt ctggttgta ttttagncat aaacgaatat atgtnccttt 3191

cccnccctgt aganaaaaaa aaaaaagaaa aanaaagcg 3230

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 695

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (120)

&lt;223&gt; "Xaa" = Pro or Leu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (123)

&lt;223&gt; "Xaa" = Arg

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (147)

&lt;223&gt; "Xaa" = Thr



2 2 / 5 2

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (166)

&lt;223&gt; "Xaa" = Ser or Leu

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (598)

&lt;223&gt; "Xaa" = Ala or Val

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 10876

&lt;400&gt; 4

Met Lys Met Lys Ser Gln Ala Thr Met Ile Cys Cys Leu Val Phe Phe

1 5 10 15

Leu Ser Thr Glu Cys Ser His Tyr Arg Ser Lys Ile His Leu Lys Ala

20 25 30

Gly Asp Lys Leu Gln Ser Pro Glu Gly Lys Pro Lys Thr Gly Arg Ile

35 40 45

Gln Glu Lys Cys Glu Gly Pro Cys Ile Ser Ser Ser Asn Cys Ser Gln

50 55 60

Pro Cys Ala Lys Asp Phe His Gly Glu Ile Gly Phe Thr Cys Asn Gln

65 70 75 80

Lys Lys Trp Gln Lys Ser Ala Glu Thr Cys Thr Ser Leu Ser Val Glu

85 90 95



2 3 / 5 2

Lys Leu Phe Lys Asp Ser Thr Gly Ala Ser Arg Leu Ser Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Ile Pro Leu His Ile Xaa Asp Phe Xaa Ala Pro Glu Thr Ile  
 115 120 125  
 Glu Ser Val Ala Gln Gly Ile Arg Lys Asn Cys Pro Phe Asp Tyr Ala  
 130 135 140  
 Cys Ile Xaa Asp Met Val Lys Ser Ser Glu Thr Thr Ser Gly Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Ala Phe Ile Val Glu Xaa Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Leu Ser Asp  
 165 170 175  
 Asn Val Thr Arg Glu Lys Met Lys Ser Tyr Ser Glu Val Ala Asn His  
 180 185 190  
 Ile Leu Asp Thr Ala Ala Ile Ser Asn Trp Ala Phe Ile Pro Asn Lys  
 195 200 205  
 Asn Ala Ser Ser Asp Leu Leu Gln Ser Val Asn Leu Phe Ala Arg Gln  
 210 215 220  
 Leu His Ile His Asn Asn Ser Glu Asn Ile Val Asn Glu Leu Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Gln Thr Lys Gly Phe His Ile Asn His Asn Thr Ser Glu Lys Ser Leu  
 245 250 255  
 Asn Phe Ser Met Ser Met Asn Asn Thr Thr Glu Asp Ile Leu Gly Met  
 260 265 270  
 Val Gln Ile Pro Arg Gln Glu Leu Arg Lys Leu Trp Pro Asn Ala Ser  
 275 280 285  
 Gln Ala Ile Ser Ile Ala Phe Pro Thr Leu Gly Ala Ile Leu Arg Glu  
 290 295 300



24/52

Ala His Leu Gln Asn Val Ser Leu Pro Arg Gln Val Asn Gly Leu Val  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Val Val Leu Pro Glu Arg Leu Gln Glu Ile Ile Leu Thr Phe  
 325 330 335  
 Glu Lys Ile Asn Lys Thr Arg Asn Ala Arg Ala Gln Cys Val Gly Trp  
 340 345 350  
 His Ser Lys Lys Arg Arg Trp Asp Glu Lys Ala Cys Gln Met Met Leu  
 355 360 365  
 Asp Ile Arg Asn Glu Val Lys Cys Arg Cys Asn Tyr Thr Ser Val Val  
 370 375 380  
 Met Ser Phe Ser Ile Leu Met Ser Ser Lys Ser Met Thr Asp Lys Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Ile Gly Leu Ser Val Ser Ile Leu Ser Leu  
 405 410 415  
 Val Leu Cys Leu Ile Ile Glu Ala Thr Val Trp Ser Arg Val Val Val  
 420 425 430  
 Thr Glu Ile Ser Tyr Met Arg His Val Cys Ile Val Asn Ile Ala Val  
 435 440 445  
 Ser Leu Leu Thr Ala Asn Val Trp Phe Ile Ile Gly Ser His Phe Asn  
 450 455 460  
 Ile Lys Ala Gln Asp Tyr Asn Met Cys Val Ala Val Thr Phe Phe Ser  
 465 470 475 480  
 His Phe Phe Tyr Leu Ser Leu Phe Phe Trp Met Leu Phe Lys Ala Leu  
 485 490 495  
 Leu Ile Ile Tyr Gly Ile Leu Val Ile Phe Arg Arg Met Met Lys Ser  
 500 505 510



25 / 52

Arg Met Met Val Ile Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Gly Cys Pro Leu Ile  
 515 520 525  
 Ile Ala Val Thr Thr Val Ala Ile Thr Glu Pro Glu Asn Gly Tyr Met  
 530 535 540  
 Arg Pro Glu Ala Cys Trp Leu Asn Trp Asp Asn Thr Lys Ala Leu Leu  
 545 550 555 560  
 Ala Phe Ala Ile Pro Ala Phe Val Ile Val Ala Val Asn Leu Ile Val  
 565 570 575  
 Val Leu Val Val Ala Val Asn Thr Gln Arg Pro Ser Ile Gly Ser Ser  
 580 585 590  
 Lys Ser Gln Asp Val Xaa Ile Ile Met Arg Ile Ser Lys Asn Val Ala  
 595 600 605  
 Ile Leu Thr Pro Leu Leu Gly Leu Thr Trp Gly Phe Gly Ile Ala Thr  
 610 615 620  
 Leu Ile Glu Gly Thr Ser Leu Thr Phe His Ile Ile Phe Ala Leu Leu  
 625 630 635 640  
 Asn Ala Phe Gln Gly Phe Phe Ile Leu Leu Phe Gly Thr Ile Met Asp  
 645 650 655  
 His Lys Ile Arg Asp Ala Leu Arg Met Arg Met Ser Ser Leu Lys Gly  
 660 665 670  
 Lys Ser Arg Ala Ala Glu Asn Ala Ser Leu Gly Pro Thr Asn Gly Ser  
 675 680 685  
 Lys Leu Met Asn Arg Gln Gly  
 690 695



26/52

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 3593

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1055)..(3016)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (2948)

&lt;223&gt; "n" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13860

&lt;400&gt; 5

cccggctaca aggctgtgac acacaagcac cacaccggct gggcaaggat ggcaaagact 60

gggctgcccc agaagggaca gagtcaggct ggaggggaat ctgatctcg gcagctcctg 120

gaccaagaga atggagcagg ggaatcagcg ctggtctcgg tctatgtaca tctggacttt 180

ccagataaga cctggccccc tgaactctcc aggacactga ctctccctgc tgccctcagct 240



27/52

tctcttcccc caaggcctct tctcactggc ctccagactca caacagagtg taatgtcaac 300

cacaagggga atttctattg tgcttgcttc tctggctacc agtggaaac cagcatctgc 360

ctccattacc ctcttgtca aagcctccac aaccaccagc ctgtggctg ccttgtcttc 420

agccatcccg aaccgggta ctgccagttg ctgccacctg ggtccccgt cacctgcctc 480

cctgcagtcc ccgggatcct caacctgaac tcccagctgc agatgctgg tgacacgtg 540

agcctgactc tccatctgag ccaggaggcc accaacctga gctggttctc gaggcacca 600

gggagcccca gtccatcct cctgcagcca gggacacagg tgtctgtgac ttccagccac 660

ggccaggctg cctcagcgt ctccaacatg tccatcact gggcagaaat ccttcttggg 720

gacagggaat gtccacaaa ggggccatcc tgggacctg ctgtctggg ttaagcactg 780

ggtggcagcg agaggacagg agcaaggctg tggtctggaa agcagcagag attctgtggt 840

gcacgggggc ccagaggagc cacatagcgc cgcacacacg tgtctgcagc tgtccatctc 900

ctgtgccacc tcccctggct tccagctgag ctgtgcac cccagacaa acctggccta 960

caccggggc tggagccctg gagagggcag caaagcttcc tcttcaacg agtcaggctc 1020



28/52

tcagtgccttt gtgctggctg ttccagcgtg cccg atg gct gac acc acg tac act 1075

Met Ala Asp Thr Thr Tyr Thr

1

5

tgt gac ctg cag agc ctg ggc ctg gct cca ctc agg gtc ccc atc tcc 1123

Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala Pro Leu Arg Val Pro Ile Ser

10

15

20

atc acc atc atc cag gat gga gac atc acc tgc cct gag gac gcc tcg 1171

Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile Thr Cys Pro Glu Asp Ala Ser

25

30

35

gtg ctc acc tgg aat gtc acc aag gct ggc cac gtg gca cag gcc cca 1219

Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala Gly His Val Ala Gln Ala Pro

40

45

50

55

tgt cct gag agc aag agg ggc ata gtg agg agg ctc tgt ggg gct gac 1267

Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val Arg Arg Leu Cys Gly Ala Asp

60

65

70

gga gtc tgg ggg ccg gtc cac rgc agc tgc aca gat gcg agg ctc ctg 1315

Gly Val Trp Gly Pro Val His Xaa Ser Cys Thr Asp Ala Arg Leu Leu

75

80

85

gcc ttg ttc act aga acc aag ctg ctg cag gca ggc cag ggc agt cct 1363



29/52

Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu Gln Ala Gly Gln Gly Ser Pro	
90	95 100
gct gag gag gtg cca cag atc ctg gca cag ctg cca ggg cag gcg gca	1411
Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gln Ala Ala	
105	110 115
gag gca agt tca ccc tcc gac tta ctg acc ctg ctg agc acc atg aaa	1459
Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu Thr Leu Leu Ser Thr Met Lys	
120	125 130 135
tac gtg gcc aag gtg gtg gca gag gcc aga ata cag ctt gac cgc aga	1507
Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala Arg Ile Gln Leu Asp Arg Arg	
140	145 150
gcc ctg aag aat ctc ctg att gcc aca gac aag gtc cta gat atg gac	1555
Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr Asp Lys Val Leu Asp Met Asp	
155	160 165
acc agg tct ctg tgg acc ctg gcc caa gcc cgg aag ccc tgg gca ggc	1603
Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln Ala Arg Lys Pro Trp Ala Gly	
170	175 180
tcg act ctc ctg ctg gct gtg gag acc ctg gca tgc agc ctg tgc cca	1651
Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr Leu Ala Cys Ser Leu Cys Pro	
185	190 195



30/52

cag gac tac ccc ttc gcc ttc agc tta ccc aat gtg ctg ctg cag agc 1699  
 Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu Pro Asn Val Leu Leu Gln Ser  
 200 205 210 215

cag ctg ttt gga ccc acg ttt cct gct gac tac agc atc tcc ttc cct 1747  
 Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Pro  
 220 225 230

act cgg ccc cca ctg cag gct cag att ccc agg cac tca ctg gcc cca 1795  
 Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile Pro Arg His Ser Leu Ala Pro  
 235 240 245

ttg gtc cgt aat gga act gaa ata agt att act agc ctg gtg ctg cga 1843  
 Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser Ile Thr Ser Leu Val Leu Arg  
 250 255 260

aaa ctg gac cac ctt ctg ccc tca aac tat gga caa ggg ctg ggg gat 1891  
 Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn Tyr Gly Gln Gly Leu Gly Asp  
 265 270 275

tcc ctc tat gcc act cct ggc ctg gtc ctt gtc att tcc atc atg gca 1939  
 Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val Leu Val Ile Ser Ile Met Ala  
 280 285 290 295

ggt gac cgg gcc ttc agc cag gga gag gtc atc atg gac ttt ggg aac 1987



3 1 / 5 2

Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu Val Ile Met Asp Phe Gly Asn

300

305

310

aca gat ggt tcc cct cac tgt gtc ttc tgg gat cac agt ctc ttc cag 2035

Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe Trp Asp His Ser Leu Phe Gln

315

320

325

ggc agg ggg ggt tgg tcc aaa gaa ggg tgc cag aca cag gtg gcc agt 2083

Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly Cys Gln Thr Gln Val Ala Ser

330

335

340

gcc agc ccc act gct cag tgc ctc tgc cag cac ctc act gcc ttc tcc 2131

Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys Gln His Leu Thr Ala Phe Ser

345

350

355

gtc ctc atg tcc cca cac act gtt cgc gaa gaa ccc gct ctg gcg ctg 2179

Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro Glu Glu Pro Ala Leu Ala Leu

360

365

370

375

ctg act caa gtg ggc ttg gga gct tcc ata ctg gcg ctg cty gtg tgc 2227

Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser Ile Leu Ala Leu Xaa Val Cys

380

385

390

ctg ggt gtg tac tgg ctg gtg tgg aga gtc gtg gtg cgg aac aag atc 2275

Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg Val Val Val Arg Asn Lys Ile

395

400

405



3 2 / 5 2

tcc tat ttc cgc cac gcc gcc ctg ctc aac atg gtg ttc tgc ttg ctg	2323
Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu Asn Met Val Phe Cys Leu Leu	
410 415 420	
gcc gca gac act tgc ttc ctg ggc gcc cca ttc ctc tct cca ggg ccc	2371
Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala Pro Phe Leu Ser Pro Gly Pro	
425 430 435	
cga agc ccg ctc ggc ctt gct gcc gcc ttc ctc tgt cat ttc ctc tac	2419
Arg Ser Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala Phe Leu Cys His Phe Leu Tyr	
440 445 450 455	
ctg gcc acc ttt ttc tgg atg ctg gcg cag gcc ctg gtg ttg gcc cac	2467
Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala Gln Ala Leu Val Leu Ala His	
460 465 470	
cag ctg ctc ttt gtc ttt cac cag ctg gca aag cac cga gtt ctc ccc	2515
Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu Ala Lys His Arg Val Leu Pro	
475 480 485	
ctc atg gtg ctc ctg ggc tac ctg tgc cca ctg ggg ttg gca ggt gtc	2563
Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys Pro Leu Gly Leu Ala Gly Val	
490 495 500	
acc ctg ggg ctc tac cta cct caa ggg caa tac ctg agg gag ggg gaa	2611



3 3 / 5 2

Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly Gln Tyr Leu Arg Glu Gly Glu

505

510

515

tgc tgg ttg gat ggg aag gga ggg gcg tta tac acc ttc gtg ggg cca 2659

Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala Leu Tyr Thr Phe Val Gly Pro

520

525

530

535

gtg ctg gcc atc ata ggc gtg aat ggg ctg gta cta gcc atg gcc atg 2707

Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly Leu Val Leu Ala Met Ala Met

540

545

550

ctg aag ttg ctg aga cct tcg ctg tca gag gga ccc cca gca gag aag 2755

Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser Glu Gly Pro Pro Ala Glu Lys

555

560

565

cgc caa gct ctg ctg ggg gtg atc aaa gcc ctg ctc att ctt aca ccc 2803

Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys Ala Leu Leu Ile Leu Thr Pro

570

575

580

atc ttt ggc ctc acc tgg ggg ctg ggc ctg gcc act ctg tta gag gaa 2851

Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly Leu Ala Thr Leu Leu Glu Glu

585

590

595

gtc tcc acg gtc cct cat tac atc ttc acc att ctc aac acc ctc cag 2899

Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe Thr Ile Leu Asn Thr Leu Gln

600

605

610

615



3 4 / 5 2

ggc gtc ttc atc cta ttg wtt ggt tgc ctc atg gac agg aag ata caa 2947

Gly Val Phe Ile Leu Leu Xaa Gly Cys Leu Met Asp Arg Lys Ile Gln

620

625

630

nga agc ttt gcg caa acg ctt ctg ccg cgc cca agc ccc cag ctc cac 2995

Xaa Ser Phe Ala Gln Thr Leu Leu Pro Arg Pro Ser Pro Gln Leu His

635

640

645

cat ctc cct ggc cac aaa tga aggtgcac ttggaacaca gcaaaggagg 3046

His Leu Pro Gly His Lys

650

aagcgacact gccagttatg aagaaaggat gacttacttg acaggaacct ctgacttttc 3106

aaacattgga gatgaagggc agaatttggg ttgtcttttc aagtttagga aaagtggaag 3166

ttaattgggc cctcttttct taacctttaa aaaatcaata taaaatgtaa gtttcttaac 3226

catatccatg tatagaggca ttgatigata tgagcacgtt gtaagaatag gttataaaaa 3286

tttaaggttt aatataaatt tatatcaatt aataaagttt aatttatatt taaaaatgaa 3346

tactagaaga aaatcttttt gaagacacca agatatctat ctggtgaat taacttatgg 3406

aatcacaaa aggaagatga caggattctg agaaattttt aaactagata cgtgaaaaaa 3466



3 5 / 5 2

gtctgatgaa tcggtctttg ttaattatgc aattcatgga tattttttat aaaatgggac 3526

gggggcattt tctgttaaaa taaaaatggg tatgctwtcs aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3586

aaaaaaaa 3593

<210> 6

<211> 653

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (79)

<223> "Xaa" = Ser or Gly

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (389)

<223> "Xaa" = Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (622)



3 6 / 5 2

&lt;223&gt; "Xaa" = Ile or Phe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (632)

&lt;223&gt; "Xaa" = unknown

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 13860

&lt;400&gt; 6

Met Ala Asp Thr Thr Tyr Thr Cys Asp Leu Gln Ser Leu Gly Leu Ala

1 5 10 15

Pro Leu Arg Val Pro Ile Ser Ile Thr Ile Ile Gln Asp Gly Asp Ile

20 25 30

Thr Cys Pro Glu Asp Ala Ser Val Leu Thr Trp Asn Val Thr Lys Ala

35 40 45

Gly His Val Ala Gln Ala Pro Cys Pro Glu Ser Lys Arg Gly Ile Val

50 55 60

Arg Arg Leu Cys Gly Ala Asp Gly Val Trp Gly Pro Val His Xaa Ser

65 70 75 80

Cys Thr Asp Ala Arg Leu Leu Ala Leu Phe Thr Arg Thr Lys Leu Leu

85 90 95

Gln Ala Gly Gln Gly Ser Pro Ala Glu Glu Val Pro Gln Ile Leu Ala

100 105 110

Gln Leu Pro Gly Gln Ala Ala Glu Ala Ser Ser Pro Ser Asp Leu Leu



37 / 52

115	120	125	
Thr Leu Leu Ser Thr Met Lys Tyr Val Ala Lys Val Val Ala Glu Ala			
130	135	140	
Arg Ile Gln Leu Asp Arg Arg Ala Leu Lys Asn Leu Leu Ile Ala Thr			
145	150	155	160
Asp Lys Val Leu Asp Met Asp Thr Arg Ser Leu Trp Thr Leu Ala Gln			
165	170	175	
Ala Arg Lys Pro Trp Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Ala Val Glu Thr			
180	185	190	
Leu Ala Cys Ser Leu Cys Pro Gln Asp Tyr Pro Phe Ala Phe Ser Leu			
195	200	205	
Pro Asn Val Leu Leu Gln Ser Gln Leu Phe Gly Pro Thr Phe Pro Ala			
210	215	220	
Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Pro Thr Arg Pro Pro Leu Gln Ala Gln Ile			
225	230	235	240
Pro Arg His Ser Leu Ala Pro Leu Val Arg Asn Gly Thr Glu Ile Ser			
245	250	255	
Ile Thr Ser Leu Val Leu Arg Lys Leu Asp His Leu Leu Pro Ser Asn			
260	265	270	
Tyr Gly Gln Gly Leu Gly Asp Ser Leu Tyr Ala Thr Pro Gly Leu Val			
275	280	285	
Leu Val Ile Ser Ile Met Ala Gly Asp Arg Ala Phe Ser Gln Gly Glu			
290	295	300	
Val Ile Met Asp Phe Gly Asn Thr Asp Gly Ser Pro His Cys Val Phe			
305	310	315	320
Trp Asp His Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Trp Ser Lys Glu Gly			



3 8 / 5 2

325	330	335	
Cys Gln Thr Gln Val Ala Ser Ala Ser Pro Thr Ala Gln Cys Leu Cys			
340	345	350	
Gln His Leu Thr Ala Phe Ser Val Leu Met Ser Pro His Thr Val Pro			
355	360	365	
Glu Glu Pro Ala Leu Ala Leu Leu Thr Gln Val Gly Leu Gly Ala Ser			
370	375	380	
Ile Leu Ala Leu Xaa Val Cys Leu Gly Val Tyr Trp Leu Val Trp Arg			
385	390	395	400
Val Val Val Arg Asn Lys Ile Ser Tyr Phe Arg His Ala Ala Leu Leu			
405	410	415	
Asn Met Val Phe Cys Leu Leu Ala Ala Asp Thr Cys Phe Leu Gly Ala			
420	425	430	
Pro Phe Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ser Pro Leu Gly Leu Ala Ala Ala			
435	440	445	
Phe Leu Cys His Phe Leu Tyr Leu Ala Thr Phe Phe Trp Met Leu Ala			
450	455	460	
Gln Ala Leu Val Leu Ala His Gln Leu Leu Phe Val Phe His Gln Leu			
465	470	475	480
Ala Lys His Arg Val Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Tyr Leu Cys			
485	490	495	
Pro Leu Gly Leu Ala Gly Val Thr Leu Gly Leu Tyr Leu Pro Gln Gly			
500	505	510	
Gln Tyr Leu Arg Glu Gly Glu Cys Trp Leu Asp Gly Lys Gly Gly Ala			
515	520	525	
Leu Tyr Thr Phe Val Gly Pro Val Leu Ala Ile Ile Gly Val Asn Gly			



3 9 / 5 2

530	535	540	
Leu Val Leu Ala Met Ala Met Leu Lys Leu Leu Arg Pro Ser Leu Ser			
545	550	555	560
Glu Gly Pro Pro Ala Glu Lys Arg Gln Ala Leu Leu Gly Val Ile Lys			
	565	570	575
Ala Leu Leu Ile Leu Thr Pro Ile Phe Gly Leu Thr Trp Gly Leu Gly			
	580	585	590
Leu Ala Thr Leu Leu Glu Glu Val Ser Thr Val Pro His Tyr Ile Phe			
	595	600	605
Thr Ile Leu Asn Thr Leu Gln Gly Val Phe Ile Leu Leu Xaa Gly Cys			
	610	615	620
Leu Met Asp Arg Lys Ile Gln Xaa Ser Phe Ala Gln Thr Leu Leu Pro			
625	630	635	640
Arg Pro Ser Pro Gln Leu His His Leu Pro Gly His Lys			
	645	650	

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



40 / 52

&lt;400&gt; 7

agatcaataa aaccgcgaat gccag

25

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 8

aggagatggg atgagaaagc gtgc

24

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 1 / 5 2

&lt;400&gt; 9

aaccacacat tggcagtcag aagg

24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 10

gcttaggatt gagacgtga gcc

23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 2 / 5 2

&lt;400&gt; 11

ctgccttgct gccgccttcc tc

22

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 12

gctggcaaag caccgagttc tc

22

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 3 / 5 2

&lt;400&gt; 13

tagtaccagc ccattcacgc ctatg

25

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 14

aggtagagcc ccagggtgac ac

22

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 4 / 5 2

&lt;400&gt; 15

actcccagca agctgtttgc a

21

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 16

gacttgggca aggtatggaa a

21

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 5 / 5 2

&lt;400&gt; 17

gtaggcctgg gcatttctat ttgca

25

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 18

ccacacatcc cttgtggtgt gttat

25

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 6 / 5 2

&lt;400&gt; 19

ggccgtcatg aactacatct t

21

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 20

caacgggctg gtctcttggt ttctt

25

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



47 / 52

&lt;400&gt; 21

gaggtcacg ccggttaagga acatg

25

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 22

cctcccggcc aggaagtaga

20

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



4 8 / 5 2

&lt;400&gt; 23

tccatctact tagggatcga ctgg

24

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 24

atctgcatca acagcagcgc caag

24

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



49 / 52

&lt;400&gt; 25

ccatcctaatacgcactcactatagggc

27

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 26

actcactataggcctcgagcggc

23

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



5 0 / 5 2

&lt;400&gt; 27

ctccaagacc cttgcct

18

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 28

gtctcccagc caccct

17

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



5 1 / 5 2

&lt;400&gt; 29

gagtcttccc agacaggtaa a

21

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 30

accacacatt ggcagtcaga a

21

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence



5 2 / 5 2

&lt;400&gt; 31

ctcactgggc ttctgggat

19

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 32

tcttgttcgc caccagac

19



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06057

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,  
C12Q1/68, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61K49/00,  
A61K35/76, G01N33/53, G01N37/00, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,  
C12Q1/68, A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61K49/00,  
A61K35/76, G01N33/53, G01N37/00, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/Geneseq  
Genbank/EMBL/DBJ/Geneseq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ross, P.C., et al., "RTA, a candidate G protein-coupled receptor: Cloning, sequencing, and tissue distribution" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, Vol.87, pages 3052 to 3056, Fig. 1	1-10, 14-32
X	WO 01/02563 A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 11 January, 2001 (11.01.01), Claims; particularly, SEQ ID NO: 9, 29 & AU 2000052498 A & EP 1196561 A2	1-10, 14-32
X	EP 711831 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD), 15 May, 1996 (15.05.96), Claims; particularly, pages 30 to 32 & CA 2162799 A & JP 08193099 A	1-10, 14-32

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
21 August, 2002 (21.08.02)

Date of mailing of the international search report  
03 September, 2002 (03.09.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06057

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/16087 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 30 May, 1996 (30.05.96), Particularly, Claim 14; Fig. 1 & GB 2291355 A & JP 10-502278 A & US 5871542 A & EP 955960 A1	1-10,14-32
X	WO 94/05695 A1 (NEW YORK UNIVERSITY), 17 March, 1994 (17.03.94), Claims; particularly, SEQ ID NO: 76 & AU 9348553 A	1-10,14-32
P,X	WO 01/81409 A2 (PE CORP.), 01 November, 2001 (01.11.01), Claims 1 to 23; Figs. 1, 2; SEQ ID NO: 1, 2 & AU 2001053771 A	1-10,14-32
P,X	WO 01/87932 A2 (LEXICON GENETICS INC.), 22 November, 2001 (22.11.01), Claim 8; SEQ ID NO: 1 to 4 & AU 2001064579 A & US 2002/031802 A1	1-10,14-32
P,X	WO 02/02598 A2 (INGENIUM PHARMACEUTICALS AG.), 10 January, 2002 (10.01.02), Claim 8; Fig. 2 & AU 2001069114 A	1-10,14-32
P,X	WO 02/10387 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 07 February, 2002 (07.02.02), Claim 1; SEQ ID NO: 13 & AU 2001080785 A	1-10,14-32
P,X	WO 02/22665 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 21 March, 2002 (21.03.02), Claims; particularly, SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6 & AU 2001084502 A	1-10,14-32
P,X	JP 2002-112793 A (Japan Science and Technology Corp.), 16 April, 2002 (16.04.02), Claims; particularly, SEQ ID NO: 31, 32, 83, 84 & JP 2002-112793 A	1-10,14-32
E,X	WO 02/053593 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 11 July, 2002 (11.07.02), Claims 1, 2, 6; SEQ ID NO: 1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18 (Family: none)	1-10,14-32



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/06057

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 11-13, 15-16 (part)  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
The "ligand", "agonist" and "antagonist" as set forth in the above claims are vaguely specified merely by the properties. Concerning these substances, namely, no specific matters (structural data, etc.) whereby those skilled in the art can usually understand specific (continued to extra sheet)
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

substances are provided. Thus, these claims are not clear to such an extent as enabling any meaningful international search.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The inventions as set forth in the claims all relate to three guanosine triphosphate-binding protein-coupled receptors (hereinafter referred to as GPCRs) encoded by the base sequences (SEQ ID NOS:1, 3 and 5) and having the amino acid sequences (SEQ ID NOS:2, 4 and 6) and methods of using the same (a method of screening a ligand, a method of examination, etc.).

As the applicant recognizes, many GPCRs had been already known at the point of the application of the present case. The claimed three GPCRs have no novel functional or structural characteristic in common other than the fact of merely being GPCRs.

Such being the case, the claims have three general inventive concepts corresponding respectively to the GPCRs each having an inherent function and structure. However, there is no novel special technical feature in common among these general inventive concepts. Therefore, it is considered that this international application fails to satisfy the requirement of unity of invention under Article 13 of the Lae (PCT Rule 13.1, 13.2 and 13.3).



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/68,  
A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61K49/00, A61K35/76, G01N33/53, G01N37/00, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N5/10, C12P21/02, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12Q1/68,  
A61K38/00, A61K45/00, A61K48/00, A61K49/00, A61K35/76, G01N33/53, G01N37/00, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/Geneseq  
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Ross, P.C., et al, "RTA, a candidate G protein-coupled receptor: Cloning, sequencing, and tissue distribution" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, Vol. 87, pp. 3052-3056, Fig.1 参照	1-10, 14-32
X	WO 01/02563 A2 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER), 2001.01.11, 請求の範囲及び特にSEQ ID NO:9, 29 参照 & AU 2000052498 A & EP 1196561 A2	1-10, 14-32

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.02

国際調査報告の発送日

03.09.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 711831 A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 1996.05.15, 請求の範囲及び特に第30-32頁参照 & CA 2162799 A & JP 08193099 A	1-10, 14-32
X	WO 96/16087 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 1996.05.30, 特に請求の範囲14 及び図1参照 & GB 2291355 A & JP 10-502278 A & US 5871542 A & EP 955960 A1	1-10, 14-32
X	WO 94/05695 A1 (NEW YORK UNIVERSITY), 1994.03.17, 請求の範囲及び特にSEQ ID NO:76 参照 & AU 9348553 A	1-10, 14-32
PX	WO 01/81409 A2 (PE CORPORATION), 2001.11.01, 請求の範囲1-23, 図1, 2 及びSEQ ID NO:1, 2 参照 & AU 2001053771 A	1-10, 14-32
PX	WO 01/87932 A2 (LEXICON GENETICS INCORPORATED), 2001.11.22, 請求の範囲8 及びSEQ ID NO:1-4 参照 & AU 2001064579 A & US 2002/031802 A1	1-10, 14-32
PX	WO 02/02598 A2 (INGENIUM PHARMACEUTICALS AG), 2002.01.10, 請求の範囲8 及び図2 参照 & AU 2001069114 A	1-10, 14-32
PX	WO 02/10387 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.), 2002.02.07, 請求の範囲1 及びSEQ ID NO:13 参照 & AU 2001080785 A	1-10, 14-32
PX	WO 02/22665 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 2002.03.21, 請求の範囲及び特にSEQ ID NO:1, 2, 5, 6 参照 & AU 2001084502 A	1-10, 14-32
PX	JP 2002-112793 A (科学技術振興事業団), 2002.04.16, 請求の範囲及び特にSEQ ID NO:31, 32, 83, 84 参照 & JP 2002-112793 A	1-10, 14-32
EX	WO 02/053593 A1 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 2002.07.11, 請求の範囲1, 2, 6 及びSEQ ID NO:1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 18 参照 (ファミリーなし)	1-10, 14-32



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 11-13, 15-16(一部) は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
上記請求の範囲中「リガンド」「アゴニスト」「アンタゴニスト」なる物質はその性質のみが漠然と特定され、その構造に関する情報その他業者が通常物質を具体的に把握するための特定事項が何ら示されていないので、同請求の範囲は有意義な国際調査をすることができる程度まで明確でない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(別紙参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## (第 I I 欄の続き)

請求の範囲に係る発明は、全て塩基配列（配列番号1, 3, 5）によりコードされる、アミノ酸配列（配列番号2, 4, 6）からなる3つのグアノシン三リン酸結合タンパク質共役型受容体（以下、GPCR）及びその利用（リガンドのスクリーニング方法、検査方法等）に関するものである。

ここで、本願出願人も認めるとおり、本願出願当時、すでに幾種類ものGPCRが既知であったところ、請求の範囲に係る発明の3種類のGPCRは相互に、単にGPCRであるという以上の機能的あるいは構造的に新規な特質を共有するものではない。

してみれば、請求の範囲には3つの固有の機能及び構造を有するGPCRそれぞれに対応する、3つの一般的発明概念が記載されているが、それぞれの一般的発明概念の間には、新規な特別の技術的特徴が共有されていないため、この国際出願は発明の単一性の要件（法施行規則第13条（PCT規則13.1、13.2及び13.3））を満たしていないと認める。



